

Philipps



Universität
Marburg

Spezielle Leistungen der Plastide:
RNA-Edierung in Landpflanzen,
Genomreduktion und Proteinimport in
Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Christopher Grosche

aus Winterberg

Marburg an der Lahn

Juli 2012

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)

als Dissertation angenommen am 23.08.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Andreas Brune

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der Disputation am 21.09.2012

*"What we know is a drop,
what we don't know is an ocean"*

Isaac Newton

Publikationen

Teile dieser Arbeit werden publiziert in:

Grosche, C; Funk, H; Maier, UG & Zauner, S (2012). The Chloroplast Genome of *Pellia endiviifolia*: Gene Content, RNA-Editing Pattern and the Origin of Chloroplast Editing. *Genome Biology and Evolution*. *Eingereicht*.

und

Bozarth, A; **Grosche, C;** Gould, SB; Lieske, S; Weber, C & Zauner, S (2012). Heterologous *in vivo* Plastid Import using Dinoflagellate Targeting Signals. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. *Eingereicht*.

weitere Publikationen:

Buchbeiträge:

Grosche, C; Hempel, F; Bolte, K; Abram, L; Maier, UG & Zauner, S (2013). Protein Import into Complex Plastids: Current Findings and Perspectives. In *Endosymbiosis*, W. Löffelhardt, Hrsg (Wien: Springer Verlag). *Eingereicht*.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGS - UND TABELLENVERZEICHNIS	VI
Abbildungen	VI
Tabellen	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Endosymbiose	1
1.1.1 Die primäre Endosymbiose	2
1.1.2 Die sekundäre Endosymbiose	4
1.2 Plastidengenome	8
1.3 RNA-Edierung	10
1.3.1 Lebermoose im Studium der RNA-Edierung	12
1.4 Proteinimport in Plastiden	13
1.4.1 Primäre Plastiden	13
1.4.2 Sekundäre Plastiden	15
1.5 Die BTS der Dinoflagellaten	18
1.5.1 Dinoflagellaten	19
2 ZIELSETZUNG	21

3	ERGEBNISSE	22
3.1	Plastidengenom und plastidäre RNA-Edierung in <i>Pellia endiviifolia</i>	22
3.1.1	Das Plastom	22
3.1.2	Der plastidäre Editotyp	24
3.2	Genetische Kompartimentierung in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	29
3.2.1	<i>Minicircles</i> in <i>A. carterae</i>	29
3.3	Plastidärer Proteinimport in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	32
3.3.1	Untersuchung der Transitpeptide Peridinin-haltiger Dinoflagellaten im heterologen System	32
3.3.2	Die Klasse I BTS in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	36
3.3.2.1	Neuklassifikation anhand von EST-Daten	36
3.3.2.2	Genomsicher Hintergrund in Proteinen mit Klasse I Transitpeptid	40
3.3.3	Untersuchungen zum Proteintransport der Klasse I Proteine im heterologen System	42
3.3.3.1	Untersuchungen zum Transport der Klasse I Proteine in <i>A. thaliana</i>	42
3.3.4	Untersuchungen zum Proteintransport im homologen System	44
3.3.4.1	Brefeldin A-sensitiver Proteinimport in die Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	44
4	DISKUSSION	49
4.1	Evolution plastidärer RNA-Edierung in Landpflanzen	49
4.1.1	Das Plastom von <i>P. endiviifolia</i>	49
4.1.2	Der plastidäre Editotyp von <i>P. endiviifolia</i>	51
4.1.3	Der plastidäre Editotyp im evolutionären Kontext	53

4.2	Genomstruktur der komplexen Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	60
4.2.1	<i>Minicircles</i> des Peridinin-haltigen Dinoflagellaten <i>A. carterae</i>	60
4.2.1.1	<i>Minicircles</i> und ihre Varianz	60
4.2.1.2	Mögliche Funktion der <i>minicircles</i>	62
4.3	Untersuchungen zum plastidären Proteinimport der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	65
4.3.1	Generelle Aspekte der Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	65
4.3.2	Die Klasse I Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	68
4.3.2.1	Grüne Genomspuren in Proteinen der Klasse I Transitpeptide	68
4.3.2.2	Aufbau und Eigenschaften der Klasse I Transitpetide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	70
4.3.2.3	Membraninsertion der Klasse I und III Proteine im Zuge des Proteinimports	75
4.3.3	Inhibition des plastidären Proteinimports in <i>A. carterae</i> durch Brefeldin A.....	77
4.3.4	Entwicklung eines modifizierten Models für den plastidären Proteinimport in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	79
4.3.5	Implikationen für die evolutionäre Entstehung der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	81
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	84
6	SUMMARY.....	85
7	MATERIAL UND METHODEN	86
7.1	Material	86
7.2	Methoden.....	91
7.2.1	Nukleinsäureanalytik.....	91
7.2.2	Klonierung	95

7.2.3	Isolation von <i>minicircles</i> und Transposonmutagenese	97
7.2.4	Midi-Plasmidisolation für die Transfektion von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	98
7.2.5	Midi-Plasmidisolation für die Transfektion von Protoplasten	98
7.2.6	Sequenzierungen	99
7.2.7	Sequenzauswertung	100
7.2.8	Transfektion.....	100
7.2.9	Proteinanalytik	102
7.2.10	Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	107
7.2.11	Elektronenmikroskopie	107
7.2.12	Phylogenetische Analyse.....	107
8	LITERATUR.....	109
9	ANHANG.....	124
9.1	Oligonukleotide für die Sequenzierung des Plastoms und die Bestimmung des Editotypen von <i>Pellia endiviifolia</i>	124
9.2	<i>Minicircles</i> aus <i>A. carterae</i>	127
9.3	Oligonukleotide <i>A. carterae</i>	132
9.4	Sequenzähnlichkeit isolierter <i>minicircles</i> zu bisher bekannten <i>minicircles</i> aus <i>A. carterae</i>	133
9.5	Zusatz zur Klassifizierung der Transitpeptidklassen I und III	134
	DANKSAGUNG	143
	CURRICULUM VITAE	144
	ERKLÄRUNG	145

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	min	Minute(n)
α	anti	mRNA	<i>messenger RNA</i>
A	Adenin	n	nano. 10^{-9}
aa	<i>amino acids</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
BFA	Brefeldin A	OEP	<i>protein of the outer envelope</i>
BLAST	Basic local alignment search tool	orf	<i>open reading frame</i>
bp	<i>base pairs</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BTS	<i>bipartite targeting signal</i>	PIC	Proteinaseinhibitor Cocktail
C	Cytosin	PPC	periplastidäres Kompartiment
cDNA	<i>complementary DNA</i>	PPM	periplastidäre Membran
Da	Dalton	RNA	Ribonukleinsäure
DIC	differentieller Interferenzkontrast	rRNA	ribosomale RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	<i>rounds per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
ECL	<i>enhanced Chemoluminescence</i>	RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SELMA	<i>symbiont-specific ERAD-like machinery</i>
EGT	endosymbiontischer Gentransfer	SDS	Natriumdodecylsulfat
EM	Elektronenmikroskop	sek	Sekunde(n)
ER	endoplasmatisches Reticulum	SP	Signalpeptid
EST	<i>expressed sequence tag</i>	SSC	<i>small single copy region</i>
G	Guanin	STD	Stop-Transferanker Domäne
x g	x-fache Erdbeschleunigung	T	Thymin
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TCA	Trichloressigsäure
h	Stunde(n)	TIC	<i>translocon of the inner chloroplast membrane</i>
HGT	horizontaler Gentransfer	TMD	Transmembrandomäne
IR	<i>inverted repeat</i>	TOC	<i>translocon of the outer chloroplast membrane</i>
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser	TP	Transitpeptid
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser	TTD	<i>thylakoid targeting domain</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>	tRNA	transfer RNA
IMS	<i>intermembrane space</i>	U	Units
k	kilo, 10^3	v/v	volume per volume
kB	kilo <i>base pairs</i>	w/v	weight per volume
KLSM	Konfokales Laser-scanning Mikroskop		
LSC	<i>large single copy region</i>		
M	Mol x l ⁻¹		
m	milli, x 10^{-3}		
μ	mikro, x 10^{-6}		

Abbildungen - und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1-1	Schematische Darstellung der primären Endosymbiose.....	3
Abbildung 1-2	Schematische Darstellung der sekundären Endosymbiose mit einer Rhodophyte	5
Abbildung 1-3	Schematisch phylogenetische Darstellung ausgewählter plastidärer Editotypen ...	11
Abbildung 1-4	Importmaschinerie der primären Plastiden	14
Abbildung 1-5	Proteinimport in komplexe Plastiden.....	16
Abbildung 1-6	Klassifizierung der Zielsteuerungssequenzen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	18
Abbildung 3-1	Plastidäres Genom des Lebermooses <i>Pellia endiviifolia</i>	23
Abbildung 3-2	Aus der plastidären RNA-Edierung in <i>P. endiviifolia</i> resultierender Austausch von Aminosäuren	27
Abbildung 3-3	Codon-unabhängiger Sequenzkontext der plastidären RNA-Edierung in <i>P. endiviifolia</i>	28
Abbildung 3-4	Alignment der <i>core</i> Region ausgewählter <i>minicircles</i> aus <i>A. carterae</i>	31
Abbildung 3-5	Konstrukte für die Lokalisation in <i>A. thaliana</i> Protoplasten.....	32
Abbildung 3-6	WesternBlot nach Transfektion der Protoplasten	33
Abbildung 3-7	Analyse der Transitpeptide von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, Cryptophyten und Heterokontophyten in <i>A. thaliana</i> Mesophyll Protoplasten.....	35
Abbildung 3-8	Sequenzlogos der hydrophoben Domäne und des potentiellen TPL2 der Klasse I Transitpeptide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	39
Abbildung 3-9	Untersuchung der phylogenetischen Tendenz einiger Proteine mit Klasse I und III Transitpeptiden	41
Abbildung 3-10	Schematische Darstellung der Konstrukte zum Test der Klasse I BTS in <i>A. thaliana</i> Mesophyll Protoplasten	42
Abbildung 3-11	Analyse der Klasse I BTS von PsdD und Rpl33 in <i>A. thaliana</i> Mesophyll Protoplasten	43
Abbildung 3-12	Effekt von Brefeldin A auf den plastidären Proteinimport der Transitpeptidklassen I – III.....	46
Abbildung 4-1	Schematische Darstellung der Phylogenie der Landpflanzen mit Fokus auf Moose und plastidäre RNA-Edierung.....	50

Abbildung 4-2	Übersicht des Sequenzkontexts verschiedener plastidäre Editotypen	55
Abbildung 4-3	Schematische Darstellung der Transitpeptidklassen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	71
Abbildung 4-4	Schematische Darstellung verschiedener plastidärer Importwege in Peridinin-haltige Dinoflagellaten	78
Abbildung 4-5	Schematische Darstellung für ein Model des plastidären Proteinimports in Peridinin-haltige Dinoflagellaten	80

Tabellen

Tabelle 3-1	Kenndaten des Plastoms von <i>P. endiviifolia</i>	24
Tabelle 3-2	Verteilung der Edierungen auf Nukleotidpositionen im Codon	25
Tabelle 3-3	Übersicht aller edierten Gene des Plastoms von <i>P. endiviifolia</i>	27
Tabelle 3-4	Übersicht der über Transposonmutagenese isolierten <i>minicircles</i> aus <i>A. carterae</i>	29
Tabelle 3-5	Grad der Sequenzähnlichkeit isolierter <i>minicircles</i> zueinander	30
Tabelle 3-6	Klassifikation der BTS mit hydrophober Domäne der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.....	38
Tabelle 4-1	Zusammenhang zwischen plastidärer RNA-Edierung und A/T-Gehalt des Plastoms....	57
Tabelle 4-2	Vergleich der Transitpeptide der Klassen I und III aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit plastidären OEPs aus Pflanzen.....	73

1 Einleitung

Der zugrunde liegende Gedanke dieser Arbeit ist die Beobachtung zellulärer Vorgänge, die sich aus grundlegenden evolutionären Entwicklungsschritten der photosynthetisch aktiven Linien ergeben. Hierbei soll einerseits die plastidäre RNA-Edierung in einer basalen Landpflanze, wie dem Lebermoos *Pellia endiviifolia*, untersucht werden um damit eine Einsicht in die Entstehung dieses Mechanismus und den Landgang der Pflanzen zu erhalten.

Andererseits stehen Mechanismen im Vordergrund, die als Konsequenz einer plastidären Endosymbiose entstehen können. Dabei wird am Beispiel des Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* die Genomorganisation der Plastide untersucht sowie die aus der sekundären Endosymbiose resultierenden Mechanismen, die einen Proteintransport in die komplexe Plastide gewährleisten. Die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zeichnen sich in diesen beiden Bereichen im Vergleich mit verwandten Organismen durch eine besondere Organisation aus. So haben sie ein äußerst reduziertes Plastidengenom, das in sogenannten *minicircles* organisiert ist. Diese Organisation ist, soweit bekannt, innerhalb der Organismen mit Plastiden einzigartig.

Die komplexe Plastide wiederum ist von drei (anstatt vier) Hüllmembranen umgeben. Bisherige Arbeiten zeigten jedoch bereits, dass der Verlust einer Membran nicht zwingend zu geringerer Komplexität im Mechanismus des Proteinimports führt, sondern vielmehr den gegenteiligen Effekt hervorzurufen scheint.

Obgleich die genannten Prozesse durchaus unterschiedlich sind, sollen diese auf den folgenden Seiten zunächst beschrieben und an den genannten Organismen untersucht werden, um anschließend in einen Kontext gebracht zu werden, der auch ihre evolutionären Implikationen mit einbezieht

1.1 Endosymbiose

Der Begriff der Endosymbiose beschreibt einen Prozess, bei dem ein Organismus einen anderen aufnimmt und im Weiteren als Endosymbionten etabliert. Erste Anzeichen einer intrazellulären Symbiose zwischen zwei Organismen wurden bereits 1883 beschrieben

(Schimper, 1883) und wenige Jahre später von Mereschkowsky eingehender dargestellt (Mereschkowsky, 1905). Die Endosymbiontentheorie in ihrer heutigen Form wurde jedoch erst 1970 von Lynn Margulis formuliert (Margulis, 1970). Die Endosymbiose darf als fundamentaler Prozess der Evolution gelten, da sowohl Mitochondrien als auch Plastiden (und damit Chloroplasten) aus diesem Prozess hervorgegangen sind (Gray *et al.*, 1999; McFadden, 1999).

Diese Arbeit fokussiert sich auf Mechanismen in Zusammenhang mit Plastiden, daher werden im Folgenden die Prozesse ihrer Entstehung genauer erläutert.

1.1.1 Die primäre Endosymbiose

Die primäre plastidäre Endosymbiose beschreibt einen Prozess, bei dem ein ancestrales Cyanobakterium von einem frühen Eukaryoten aufgenommen und sukzessive als Endosymbiont etabliert wurde (McFadden, 1999; Cavalier-Smith, 2000; Keeling, 2010). Es gilt heute als weitgehend gesichert, dass die rezenten Linien der Glaucophyten, Rhodophyten und Chlorophyten (und damit Viridiplanta) mit primärer Plastide monophyletischen Ursprungs sind (Martin and Herrmann, 1998; Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2005) (Abbildung 1-1). Diese aus einem einzelnen Endosymbioseereignis hervorgegangenen Plastiden sind von zwei Hüllmembranen umgeben. Die innere dieser beiden Membranen entspricht dabei der ursprünglichen Plasmamembran des Cyanobakteriums (Cavalier-Smith, 2000). Die äußere Membran primärer Plastiden enthält sowohl prokaryote als auch eukaryote Bestandteile (z.B. Lipide) und ist damit vermutlich eine Chimäre der Nahrungsvakuole des Wirts und der äußeren bakteriellen Membran (Bölter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999). Im Falle der Glaucophyten, die in den drei genannten Linien eine Sonderrolle einnehmen, befinden sich zwischen diesen beiden Membranen noch eine Peptidoglycanschicht der ursprünglichen bakteriellen Zellwand (Pfanzagl *et al.*, 1996).

Die drei rezenten Linien (Glaucophyten, Rhodophyten und Chlorophyten) werden auch als Archaeplastida bezeichnet (Adl *et al.*, 2005). Obwohl die Verzweigung der Linien voneinander nach wie vor diskutiert wird, deutet vieles darauf hin, dass die Glaucophyten die zuerst abzweigende Linie der Archaeplastida darstellen (Steiner and Löffelhardt, 2002; Adl *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2011).

Im Zuge der Etablierung eines Endosymbionten kommt es zu diversen Anpassungen bei Wirt und Symbiont. Als Antwort auf die veränderte Lebensweise des Symbionten gehen nicht mehr benötigte Gene verloren, andere werden in das Genom des Wirtes transferiert und integriert. Dies führte zu einer generellen Reduzierung des Genoms des ursprünglichen Cyanobakteriums (Martin and Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 1998; Kleine *et al.*, 2009). Die Genome der Plastiden werden im Punkt 1.2 genauer betrachtet.

In der Gesamtheit wird der Symbiont nicht nur genomisch, sondern daraus resultierend auch metabolisch reduziert, gerät somit in vollständige Abhängigkeit zum Wirt und wird zum

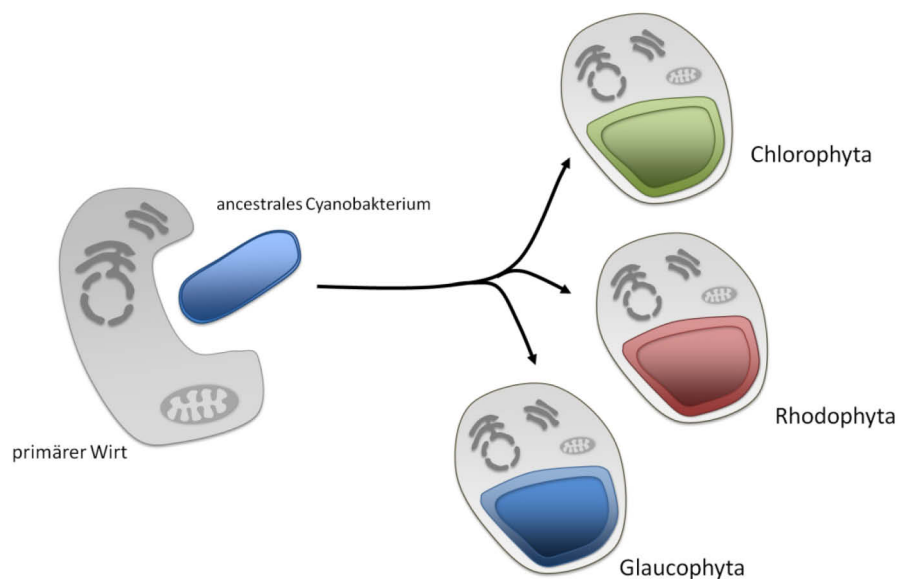


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der primären Endosymbiose

Plastiden sind aus einer sogenannten primären Endosymbiose hervorgegangen. Bei diesem Vorgang wurde ein ancestrales Cyanobakterium von einem Eukaryoten aufgenommen und sukzessive als Organell etabliert. Die primäre Plastide ist von zwei Membranen umgeben. Aus diesem, vermutlich monophyletischen Ereignis sind die rezenten Linien der Chlorophyten (aus denen auch die Landpflanzen hervorgegangen sind), Rhodophyten und Glaucophyten entstanden

Organell (Leister, 2005). Darüber hinaus müssen Genprodukte, die nun auf dem Kerngenom des Wirtes codiert sind, zur Aufrechterhaltung des Symbionten und seiner Funktion reimportiert werden. Dazu bedarf es geeigneter Zielsteuerungssequenzen und einer Importmaschinerie (Martin and Herrmann, 1998) (ein detaillierter Einblick in den plastidären Proteinimport wird in Punkt 1.4 gegeben).

Der Wirt wiederum hat durch diese Symbiose mit einem vormaligen Cyanobakterium deutliche Vorteile. Das neue Organell ist ein Energielieferant, da es Photosynthese betreiben kann. Dies dürfte als eine treibende Kraft für eine solche Endosymbiose gelten (Weber *et al.*, 2006). Im Weiteren stellt der Endosymbiont Syntheseleistungen und bringt neue metabolische Kapazitäten/Wege mit ein. Dadurch sind die heute zu beobachtenden

Interaktionen zwischen Wirt und Endosymbiont sehr komplex und deutliche Trennlinien sind daher nur noch schwierig zu ziehen (Martin *et al.*, 2002; Timmis *et al.*, 2004; Kleine *et al.*, 2009).

1.1.2 Die sekundäre Endosymbiose

Obwohl die Archaeplastida bereits eine hohe Diversität zeigen, besitzen viele rezenten Algen keine primäre Plastide. Der Großteil der uns bekannten und ökologisch bedeutsamen Algenarten hat sekundäre bzw. komplexe Plastiden (Cavalier-Smith, 2004), welche durch sekundäre (oder auch tertiäre) Endosymbioseereignisse entstanden sind. In diesem Vorgang wurde ein photosynthetisch aktiver Eukaryot von einem anderen Eukaryoten aufgenommen und wiederum sukzessive als Endosymbiont bzw. Organell etabliert (McFadden, 2001; Keeling, 2010). Heute können wir eine hohe Diversität an Organismen beobachten, die aus einem solchen Endosymbiosevorgang entstanden sind. Diese äußert sich sowohl in der Art der Plastide und ihrer Membranarchitektur als auch in der Anzahl der möglichen Wirte und ihrer Endosymbionten. Damit resultiert diese weitere Endosymbiose in höherer Komplexität im Vergleich zur primären Plastide und ist damit auch schwieriger zu ergründen (Keeling, 2010).

Es gilt heute als weitgehend akzeptiert, dass eine solche sekundäre Endosymbiose mindestens dreimal unabhängig voneinander stattgefunden haben muss. Grundsätzlich unterteilt man diese Endosymbiose in eine 'grüne' und 'rote' Linie, abhängig von dem beteiligten Endosymbionten, wie er heute zu beobachten ist. In der grünen Linie entstanden die heute vorkommenden Linien der Euglenophyten und Chlorarachniophyten durch die Aufnahme einer ancestralen Chlorophyte. Dieses Ereignis gilt als polyphyletisch und scheint damit zweimal unabhängig voneinander aufgetreten zu sein (Rogers *et al.*, 2007). Die rote Linie geht aus der Endosymbiose mit einer Rhodophyte hervor und galt lange Zeit als monophyletischer Vorgang. Dadurch wurden die daraus entstandenen Gruppen der Cryptophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Apicomplexa und Dinoflagellata trotz ihrer hohen Diversität als Supergruppe der Chromalveolata zusammengefasst (Cavalier-Smith, 1999) (Abbildung 1-2). Diese Gruppen machen einen bedeutenden Teil der uns heute bekannten Protisten aus. Momentan wird angenommen, dass 50% aller bekannten Protisten

aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hervorgegangen sind (Cavalier-Smith, 2004).

Wie bereits erwähnt kam es durch die sekundäre Endosymbiose zu einer hohen Plastidendiversität. Dies bezieht sich sowohl auf ihren Grad der Reduktion als auch auf ihre Membranarchitektur. Die Plastiden der Dinoflagellaten und Euglenophyten sind von drei Membranen umgeben, während die Plastiden der anderen Gruppen allesamt von vier Hüllmembranen umgeben sind. Allerdings ist die äußere dieser vier Membranen bei Cryptophyten, Heterokontophyten und Haptophyten im Kontinuum mit dem Wirts-ER. Bei Apicomplexa und Chlorarachniophyten ist eine solche Verbindung nicht gegeben (Abbildung 1-5) (Bolte *et al.*, 2009). Zusätzlich enthalten die Plastiden der Cryptophyten, sowie der

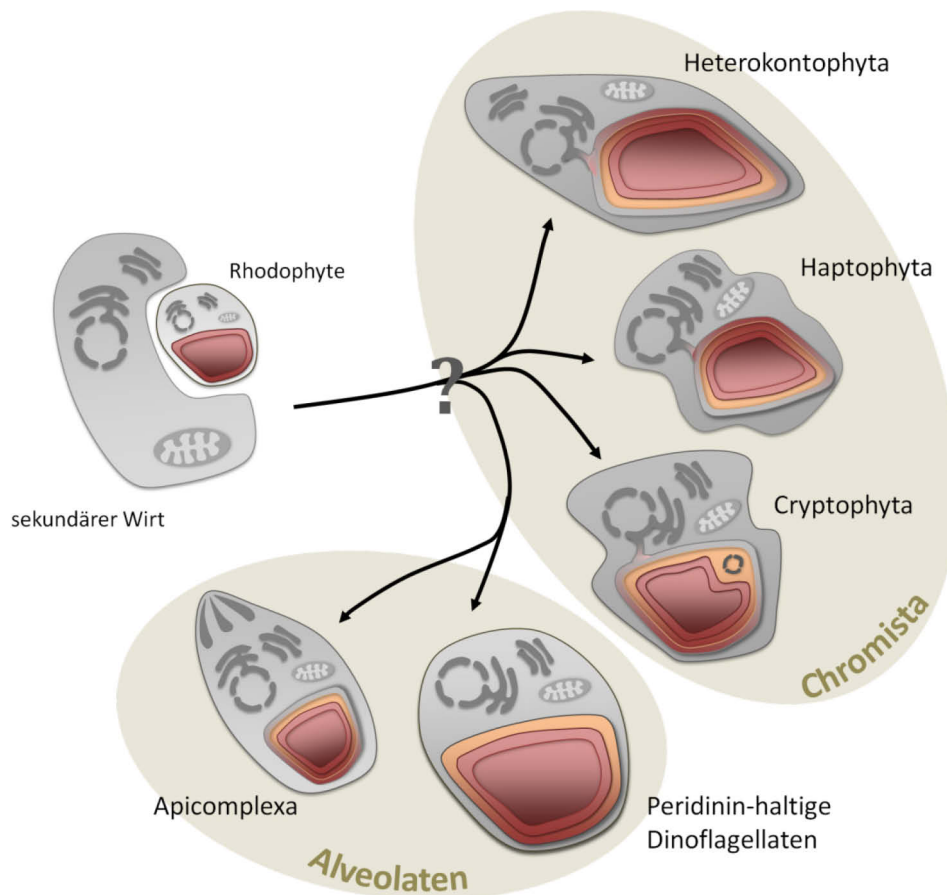


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der sekundären Endosymbiose mit einer Rhodophyte

Die rezenten Linien der Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Apicomplexa und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (zusammengefasst als Chromalveolaten) sind aus einer sekundären Endosymbiose hervorgegangen. Bei diesem Vorgang wurde eine Rhodophyte von einem Eukaryoten aufgenommen und sukzessive als Organell etabliert. Dies führte zu komplexen Plastiden, die von drei (Peridinin-haltige Dinoflagellaten) oder vier Membranen (Heterokonto-, Hapto-, Cryptophyten und Apicomplexa) umgeben sind. In Cryptophyten ist im peri-plasmatischen Kompartiment (PPC) (zwischen zweiter und dritter Membran) noch der ehemalige Zellkern der Rotalge als stark reduzierter Nukleomorph erhalten geblieben. Apicomplexa sind Parasiten und bei ihnen ist die Plastide als nicht mehr photosynthetisch aktiver, sogenannter Apicoplast erhalten geblieben. Ob die Chromalveolaten monophyletischen Ursprungs sind, ist Gegenstand aktueller Diskussion (siehe Text).

Chlorarachniophyten in der grünen Linie, noch den ehemaligen Zellkern des jeweiligen Endosymbionten (Rhodophyte bzw. Chlorophyte). Dieser Zellkern ist jedoch deutlich reduziert und wird als Nukleomorph bezeichnet (Maier *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2001; Gilson *et al.*, 2006).

Dieser Nukleomorph liegt zwischen zweiter und dritter Hüllmembran (die Zählung der Membranen erfolgt in dieser Arbeit von außen) im sogenannten periplastidären Kompartiment (PPC), welches das ehemalige Cytoplasma des Endosymbionten darstellt (Hibberd and Norris, 1984; Maier *et al.*, 2000). Die inneren beiden Hüllmembranen entsprechen der äußeren und inneren Membran der primären Plastide, die zweite Membran der ehemaligen Cytoplasmamembran des Endosymbionten und die äußerste Membran vermutlich der Nahrungsvakuole des Wirtes (Cavalier-Smith, 2000).

Im Falle von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten ist es umstritten welche Membran reduziert wurde, da dies auch direkt mit dem Ursprung der Plastide als solche im Zusammenhang steht. Dazu wurden verschiedene Theorien entwickelt, die hier jeweils im Vergleich mit komplexen Plastiden mit vier Hüllmembranen dargestellt sind. Zum einen wird vermutet, dass die zweite Membran (periplastidäre Membran – PPM), also die ehemalige Cytoplasmamembran des Endosymbionten, reduziert wurde (Cavalier-Smith, 1999). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die äußere (diese entspräche der Nahrungsvakuole des Wirtes) (Gibbs, 1981) oder eine der beiden inneren Membranen, also eine Membran der ursprünglich primären Plastide, verloren gegangen sind. Da diese beiden Gruppen experimentell bisher nur schwer zugänglich sind, konnten auch nur wenige Daten gesammelt werden, die genauere Aussagen zulassen.

Neueren Erkenntnissen nach müssen jedoch, neben dem heutigen Status, auch die etwaigen Zwischenstadien im Verlauf der Evolution beachtet werden. So gilt die Entstehung durch eine 'simple' sekundäre Endosymbiose nicht als gesichert. Durch die Vielzahl mittlerweile erhaltenen Genomdaten und damit identifizierter 'grüner Genomspuren' in Gruppen der Chromalveolaten, wird auch die, zumindest zeitweise, sequentielle Endosymbiose diskutiert. Das heißt, dass zusammen mit oder vor dem heutigen roten Endosymbiont eventuell auch grüne Endosymbionten vorhanden waren. Ein möglicher Ursprung dieser 'grünen Genen' kann jedoch auch lateraler Gentransfer (LGT) sein (Frommolt *et al.*, 2008; Moustafa *et al.*, 2009; Deschamps and Moreira, 2012). Des Weiteren ist der vorgeschlagene monophyletische Ursprung der Chromalveolaten (Cavalier-Smith, 1999) nicht eindeutig

gesichert. Nach neueren phylogenetischen Untersuchungen gruppieren die Dinoflagellaten zwar nach wie vor zusammen mit den photosynthetisch inaktiven und parasitischen Apicomplexa und Ciliaten, die keine Plastiden mehr besitzen (zusammen bilden sie die Alveolata) (Moore *et al.*, 2008; Janouškovec *et al.*, 2010). Die Stellung der Cryptophyten, Heterokontophyten und Haptophyten (diese Gruppen werden als Chromista zusammengefasst) untereinander und zu den Alveolaten konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden (Keeling, 2009). Dabei ist vor allem auch auf die Möglichkeit zu achten, dass es sich um unterschiedliche Wirte handeln kann bzw. um den 'gleichen' Wirt, jedoch jeweils mit unterschiedlicher evolutionärer Vorgeschichte. Somit kann nicht unbedingt davon ausgegangen werden, dass die Chromalveolaten wirklich monophyletischen Ursprungs sind. Nach heutigem Erkenntnisstand führten eventuell auch zwei (oder mehr) eigenständige Endosymbioseereignisse zu den rezenten Gruppen mit 'rotem' Endosymbionten, jedoch kann eine Monophylie bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden (Archibald, 2009). Damit stellt sich der Verlauf der sekundären Endosymbiose als sehr komplex dar und weitere Untersuchungen werden dazu beitragen einen genaueren Einblick in die evolutionären Vorgänge, die zu den heutigen Algengruppen mit komplexer Plastide führten, zu erhalten.

Auch mit diesem sekundären Endosymbioseereignis(en) kam es zu Gentransfer und Genverlust im Verlauf der Reduktion des Endosymbionten. Dabei wurden nicht nur Gene von der Plastide in den Kern des sekundären Wirtes transferiert, sondern auch Gene von Nukleus (des primären Wirtes) zu Nukleus (des sekundären Wirtes) (Kleine *et al.*, 2009).

Des Weiteren stellt die komplexere Membranarchitektur der Plastide eine zusätzliche Hürde für den Proteinimport und damit auch den Aufbau der Zielsteuerungssequenzen dar (Punkt 1.6.2).

Wir können heute auch zahlreiche tertiäre Endosymbiosen beobachten. Bei diesen erneuten Endosymbiosen treten meist Dinoflagellaten als Wirt und eine Hapto- oder Heterokontophyte als Endosymbiont auf (z.B. *Dinophysis sp.*, *Durinska sp.*, *Karlodinium sp.*) (Archibald, 2009; Keeling, 2010). Die Existenz dieser tertiären Endosymbiosen zeigt, wie dynamisch und komplex Endosymbiosen sind und dass sie einen fortschreitenden Prozess darstellen.

1.2 Plastidengenome

Organellengenome wurden erstmals in den 1960er Jahren identifiziert (Ris and Plaut, 1962; Chun *et al.*, 1963). Dies stützte die Idee, dass es sich bei Plastiden und Mitochondrien um Endosymbionten handelt. Wie bereits erwähnt, kommt es im Zuge der Etablierung des Endosymbionten auch zur Reduktion des symbiontischen Genoms. Diese Reduktion beinhaltet zum einen Genverlust, vor allem durch die neuen Lebensbedingungen und den dadurch wegfallenden Bedarf (da z.B. nicht mehr direkt auf Umwelteinflüsse reagiert werden muss), und zum anderen den Gentransfer in den Nukleus des Wirts (Martin and Herrmann, 1998; Kleine *et al.*, 2009). Die Genome primärer und sekundärer Plastiden unterscheiden sich in der Grundstruktur und Größe, bis auf wenige Ausnahme, nur in einem gewissen Maße, daher werden sie hier gemeinsam betrachtet.

Plastidengenome (auch: Plastome) sind zumeist zirkuläre DNA-Moleküle mit einer Größe von ca. 70 – 200 kB (Green, 2011). Ausnahmen bilden hier die Plastome von parasitisch lebenden Organismen wie den Apicomplexa, diese sind meist kleiner (Wilson *et al.*, 1996). Die Struktur von Plastidengenomen ist über die verschiedenen Gruppen hinweg durchaus unterschiedlich, häufig jedoch ist das Plastom in eine *large single copy* (LSC) Region, eine *small single copy* (SSC) Region und *inverted repeats* unterteilt. Die Grenzen zwischen diesen Abschnitten und deren Codierungskapazität kann gruppen- bzw. artspezifisch unterschiedlich sein. Auf diesen Genomen sind primär Untereinheiten des Photosynthese- und Elektronentransportapparates (*atp*, *psa*, *psb*, *ndh*, *pet*) und auch Bestandteile für die eigene Proteinbiosynthese (*rpo*, *rpl*, *rps*, *rrn*, *trn*) codiert. Darüber hinaus einzelne, teils spezifische Gene, deren Funktion zum Teil noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (z.B. *ycfs* – *hypothetical chloroplast open reading frame* und *orfs* – *open reading frame*) (Palmer and Logsdon, 1991; Sugiura, 1995). Warum gerade vor allem diese Gengruppen noch auf den Plastidengenomen codiert sind, ist noch immer Gegenstand intensiver Diskussion (Allen, 2003; Allen *et al.*, 2005; Daley and Whelan, 2005).

Ein Trend ist darin zu erkennen, dass die Codierungskapazität der Plastome von den Grünalgen zu den Rotalgen zunimmt. Das heißt, dass auf den Plastidengenomen der Chlorophyten und auch der Viridiplanta meist 90 – 100 Gene codieren, bei Glaucophyten ca.

190 (bisher wurde in dieser Gruppe mit *Cyanophora paradoxa* nur ein Vertreter sequenziert (Stirewalt *et al.*, 1995)) und bei Rhodophyten 232 – 251 (Green, 2011). Den Plastidengenomen der Rotalgen fehlen zudem die *inverted repeats* (Hagopian *et al.*, 2004). Plastidengenome sekundärer Plastiden sind meist etwas kleiner als die der Chlorophyten (Chlorarachniophyta) und Rhodophyta (Chromalvelaten). Ihren Plastomen fehlen die Introns, abgesehen von den Euglenophyten und einer bisher bekannten Ausnahme in der ‚roten Linie‘ (*Rhodomonas*) (Hallick *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2007). Unterschiede sind auch zwischen den Plastidengenomen der ‚terrestrischen‘ und ‚aquatischen‘ Organismen, d.h. den Plastomen der Landpflanzen (Embryophyta) und der Algen, zu erkennen. Diese Unterschiede liegen vor allem in den codierten Genen. So fehlen z.B. die *ndh*-Gene bei Algen, sind jedoch bei Landpflanzen, bis auf wenige Ausnahmen (Braukmann *et al.*, 2009; Chris Blazier *et al.*, 2011), noch auf dem Plastidengenom codiert.

Eine Sonderstellung nehmen auch in diesem Bereich die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ein. Ihr Plastidengenom scheint zum einen in einem sehr hohen Maße reduziert zu sein (Hackett *et al.*, 2004) und zum anderen sind noch codierte Gene auf sogenannten *minicircles* organisiert (Zhang *et al.*, 1999b; Barbrook and Howe, 2000; Hiller, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Laatsch *et al.*, 2004; Nisbet *et al.*, 2004; Barbrook *et al.*, 2006). *Minicircles* variieren in ihrer Größe zwischen 2 – 10 kB, abhängig von der betrachteten Gruppe. Auf einem *minicircle* sind 1 – 5 Gene codiert oder sie sind ‚leer‘, das heißt, dass kein vollständiger *orf* identifiziert werden kann. Ein generelles Merkmal dieser *minicircles* ist weiterhin, dass sie eine *core*-Region besitzen, für die eine Funktion als Replikationsursprung diskutiert wird (Zhang *et al.*, 2002). Dieser *core* scheint innerartlich konserviert zu sein (Zhang *et al.*, 1999b; Barbrook and Howe, 2000; Hiller, 2001). In der Gesamtzahl, betrachtet man alle bisher untersuchten Arten, konnten nur 17 auf *minicircles* codierte Gene identifiziert werden. Bisher konnten nur Gene der Gruppen *atp*, *psa/psb* und *ndh*, zwei ribosomale Proteine und zwei hypothetisch konservierte Proteine (*ycf*) identifiziert werden. Damit sind die Plastome der Dinoflagellaten die kleinsten, bekannten Plastidengenome überhaupt (Howe *et al.*, 2008).

Für den Dinoflagellaten *Ceratium horridum* wurde gezeigt, dass die *minicircles* im Kern lokalisieren und in der Plastide noch ein reduziertes, höchst repetitives Plastidengenom vorhanden ist (Laatsch *et al.*, 2004). Eine Kernlokalisierung von *minicircles* konnte jedoch für andere Arten nicht bestätigt werden (Takishita *et al.*, 2003; Wang and Morse, 2006).

1.3 RNA-Edierung

Die RNA-Edierung beschreibt einen Prozess bei dem Nukleotide co- oder posttranskriptionell in der RNA verändert bzw. ediert werden. Diese Veränderungen beinhalten Insertion, Deletion, Substitution und Transition. Dies bedeutet, dass die ursprüngliche, auf der DNA codierte Sequenzabfolge verändert wird (Gott and Emeson, 2000).

Die RNA-Edierung in Organellen wurde zunächst in Mitochondrien von Trypanosomen beobachtet (Benne *et al.*, 1986), die in Art und Umfang jedoch die Edierung in Organellen der Landpflanzen übertrifft. Nur wenig später konnte dieser Prozess auch in Mitochondrien (Covello and Gray, 1989; Hiesel *et al.*, 1989) und Plastiden der Embryophyta identifiziert werden (Hoch *et al.*, 1991; Maier *et al.*, 1992).

Der Ursprung und die Funktion der RNA-Edierung in Organellen sind noch nicht geklärt und Gegenstand intensiver Diskussion. Da viele Edierungen der mRNA dazu führen, dass das Codon nach der Edierung für eine andere Aminosäure codiert, wird zum einen vermutet, dass die Edierung der Wiederherstellung von Codons dient, die für im Protein funktionell bedeutende Aminosäuren codieren (Maier *et al.*, 1996). Häufig ist auch eine Wiederherstellung eines Start- oder Stopcodons zu beobachten. Demnach ist es zu Mutationen gekommen, deren negativer Effekt durch diesen Mechanismus ‚rückgängig‘ gemacht wird (Tillich *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2008). Zum anderen stehen Funktionen der Genregulation zur Debatte, dies aber vor allem bei der mitochondriellen RNA-Edierung (Hanson *et al.*, 1996; Hirose and Sugiura, 1997). Obwohl Edierung bisher immer, sofern ediert wird, in beiden Organellen gezeigt werden konnte (Freyer *et al.*, 1997; Steinhauser *et al.*, 1999), wird jedoch immer deutlicher, dass es im Funktionsumfang der Edierungen Unterschiede zwischen Mitochondrien und Plastiden zu geben scheint. Zumeist kann in Mitochondrien eine deutlich höhere Anzahl an Edierungsstellen identifiziert werden (Brennicke *et al.*, 1999; Gott and Emeson, 2000). Da sich diese Arbeit auf plastidäre RNA-Edierung beschränkt, soll diese im Weiteren genauer betrachtet werden.

Der Umfang der RNA-Edierung ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. In Algen konnte bisher, mit Ausnahme einzelner Dinoflagellaten (Zauner *et al.*, 2004; Wang and Morse, 2006), keine RNA-Edierung in Plastiden oder Mitochondrien beobachtet werden. Im

Bereich der Embryophyta wurden bisher jedoch zahlreiche plastidäre Editotypen (Anzahl aller Edierungen) bestimmt. Diese Editotypen zeigen deutliche Unterschiede im Umfang der Edierung zwischen den einzelnen Gruppen und Klassen der Landpflanzen (Abbildung 1-3). Im Falle der RNA-Edierung in Organellen wurden bisher nur Transitionen von Cytidin zu Uridin ($C \rightarrow U$) bzw. Uridin zu Cytidin ($U \rightarrow C$) beobachtet (Maier *et al.*, 1996; Tillich *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2008).

Innerhalb der Spermatophyten (Samenpflanzen) zeigt die plastidäre Edierung eine relativ geringe Varianz. Hier liegen zumeist 25-54 Edierungsstellen vor (Wakasugi *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1999; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002; Tillich *et al.*, 2005; Tillich *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2012). Bedeutend größere Unterschiede zeigen sich im Vergleich mit den Farnen und Moosen. So werden bei der Lycophyte *Selaginella moellendorffii* 104 plastidäre Edierungen erwartet (beruhend auf Hochrechnungen) (Smith, 2009) und bei dem Farn *A. capillus-veneris* wurden 340 Edierungsstellen identifiziert (Wolf *et al.*, 2004). Mit 942 Edierungen konnten bei dem Hornmoos *A. formosae* die bisher höchste Anzahl an plastidären Edierungen beobachtet werden (Kugita *et al.*, 2003). Bemerkenswert ist weiterhin, dass bei Samenpflanzen ausschließlich $C \rightarrow U$ Transitionen zu beobachten sind. Nur im Falle der Hornmoose und Farne konnte auch der $U \rightarrow C$ Typ identifiziert werden (Kugita *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004).

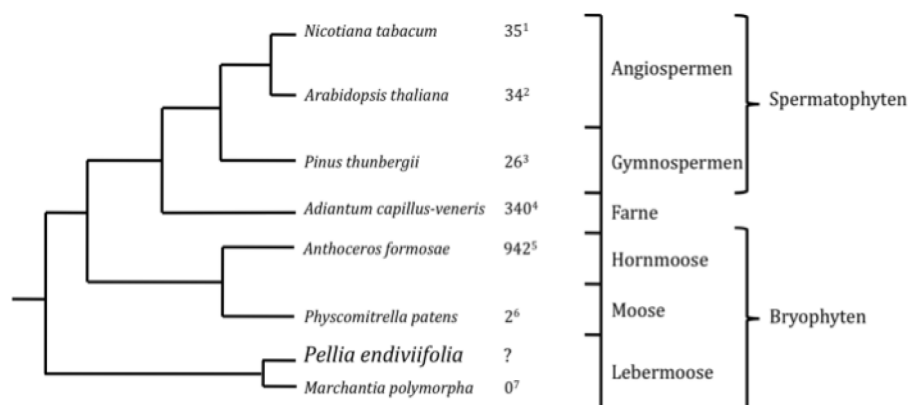


Abbildung 1-3 Schematisch phylogenetische Darstellung ausgewählter plastidärer Editotypen

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung ausgewählter plastidärer Editotypen unter Berücksichtigung der Phylogenie der Landpflanzen (nach Qiu *et al.*, 2006); die Zahlen geben jeweils die Anzahl aller identifizierten plastidären Edierungsstellen an, ¹ (Hirose *et al.*, 1999, Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002); ²: (Tillich *et al.*, 2005); ³: (Wakasugi *et al.*, 1996); ⁴: (Wolf *et al.*, 2004); ⁵: Kugita *et al.*, 2003b); ⁶: (Miyata *et al.*, 2002, Miyata & Sugita, 2004, Rüdinger *et al.*, 2009); ⁷ (Freyer *et al.*, 1997; Steinhäuser *et al.*, 1999).

Eine besondere Situation zeigt sich innerhalb der Lebermoose. Das Lebermoos *Marchantia polymorpha* zeigt keinerlei Edierung, weder mitochondriell noch plastidär (Freyer *et al.*,

1997; Steinhauser *et al.*, 1999; Tillich *et al.*, 2006). Weitere Analysen zeigten, dass in der Klasse der Marchantiopsida die RNA-Edierung in den Organellen vollständig fehlt. RNA-Edierung konnte jedoch in anderen Klassen der Lebermoose gezeigt werden (Steinhauser *et al.*, 1999; Groth-Malonek *et al.*, 2007; Rüdinger *et al.*, 2008).

Mittlerweile gilt der sekundäre Verlust der RNA-Edierung in Organellen in den Marchantiopsida als wahrscheinlicher als ein grundsätzliches Fehlen bzw. eine sekundäre Ausbildung von RNA-Edierung in den übrigen Klassen der Lebermoose (Tillich *et al.*, 2006; Groth-Malonek *et al.*, 2007). Bisher fehlen jedoch Studien zu vollständigen Editotypen in weiteren Lebermoosen, vor allem im Bezug auf die plastidäre Edierung.

Das Wissen über den genauen Prozess der RNA-Edierung in Organellen ist bisher noch immer gering. Am Prozess der Edierung sind sowohl *cis*- als auch *trans*-Elemente beteiligt. Als *cis*-Elemente werden Sequenzbereiche bezeichnet, die eine Interaktion der Edierungsfaktoren mit der spezifischen Edierungsstelle ermöglichen. Als *trans*-Faktoren sind vor allem die sogenannten, kerncodierten *Pentatricopeptide Repeat* (PPR) Proteine, und dabei besonders deren DYW-Unterklasse, von Bedeutung (Small and Peeters, 2000; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001; Schmitz-Linneweber and Small, 2008; Qi *et al.*, 2012). Das Auftreten im Kerngenom codierter DYW-PPR Proteine korreliert mit der Anzahl der Edierungsstellen in den Organellen (Salone *et al.*, 2007; Fujii and Small, 2011; Rüdinger *et al.*, 2012). Zahlreiche identifizierte Mutanten dieser Proteine lassen den Schluss über eine direkte Beteiligung bei dem Prozess der RNA-Edierung zu (Kotera *et al.*, 2005; Hammani *et al.*, 2009; Okuda *et al.*, 2009; Takenaka *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass die eigentliche Edierung und damit Transition durch eine Des- bzw. Transaminierung am C-4 des Cytosins bzw. Uracils erreicht wird (Hirose and Sugiura, 2001), allerdings konnte das dafür zuständige Enzym bisher nicht mit letzter Sicherheit identifiziert werden (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999; Salone *et al.*, 2007).

1.3.1 Lebermoose im Studium der RNA-Edierung

Die Lebermoose (Marchantiophyta) gelten als besonders basale Landpflanzen und bilden phylogenetisch eine Schwestergruppe zu den übrigen Embryophyta (Qiu *et al.*, 2006).

Ihre Wuchsform ist thallös bis filamentös und mit 6000-8000 Arten sind sie global verbreitet. Das in dieser Arbeit verwendete, einfach-thallöse Lebermoos *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort (Kelch-Beckenmoos) ist innerhalb der Lebermoose in die Klasse der Pelliopsida

(Überklasse III) eingeordnet (Qiu *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2009). Damit gehören sie einer Schwesterklasse der Marchantiopsida (Überklasse II) an. In dieser Klasse wurde anhand von *Marchantia polymorpha* das Fehlen von RNA-Edierung in Organellen gezeigt (Freyer *et al.*, 1997; Steinhauser *et al.*, 1999).

Ihre phylogenetische Einordnung und die Beibehaltung ancestraler Eigenschaften prädestinieren die Lebermoose für Untersuchungen zu frühen evolutionären Vorgängen, wie dem Landgang der Pflanzen und der Entstehung plastidärer RNA-Edierung.

1.4 Proteinimport in Plastiden

1.4.1 Primäre Plastiden

Wie bereits beschrieben, sind primäre Plastiden aus einer Endosymbiose mit einem Cyanobakterium hervorgegangen und von zwei Membranen umgeben. Im Zuge der Etablierung als Organell kam es zum Gentransfer vom Endosymbionten in den Nukleus des Wirtes. Die Genprodukte dieser transferierten Gene müssen zur Aufrechterhaltung des Endosymbionten reimportiert werden (Martin and Herrmann, 1998). Um eine korrekte Lokalisation dieser Proteine zu erreichen, bedarf es geeigneter Zielsteuerungssequenzen. Diese Zielsteuerung wird zumeist durch sogenannte, N-terminale Transitpeptide gewährleistet. Transitpeptiden fehlt eine einheitliche Konsensussequenz, sie weisen allerdings erhöhte Anteile an hydroxylierten (vor allem Serin und Threonin) und basischen Aminosäuren auf, die Nettoladung ist positiv (Patron and Waller, 2007). Im Zuge des Imports in die Plastide wird das Transitpeptid durch eine *stromal processing peptidase* (SPP) entfernt (Richter and Lamppa, 1998). Nach der Translation im Cytosol erfolgt die Translokation der Vorläuferproteine (*precursor*) über die Translokatoren der äußeren (TOC – *translocon of the outer envelope membrane of chloroplast*) und der inneren (TIC – *translocon of the inner envelope membrane of chloroplast*) Plastidenmembran. Diese Translokatoren sind Multiproteinkomplexe und entscheidend für den Import der meisten in der Plastide lokalisierten Proteine (Schnell *et al.*, 1997). Hauptkomponenten des TOC-Komplexes sind Toc75, als eigentliches Kanalprotein, Toc159 und Toc34, als GTPasen bzw. Rezeptoren des Translokationssystems (Kessler *et al.*, 1994; Schnell *et al.*, 1994). Es muss jedoch angemerkt

werden, dass vor allem die genauen Mechanismen zwischen Toc159 und Toc34 noch immer Gegenstand intensiver Debatte sind (Kouranov and Schnell, 1997; Becker *et al.*, 2004). Toc75 ist ein β -Barrel Membranprotein und Mitglied der Omp85 Familie mit homologen Proteinen in Mitochondrien und gram-negativen Bakterien (Schnell *et al.*, 1994).

Die wichtigsten Bestandteile der TIC-Maschinerie scheinen Tic20/21, Tic110, Tic40 und Hsp93 zu sein. Es wird vermutet, dass Tic20 und Tic21 zusammen den Proteinkanal für die Translokation bilden (Kouranov *et al.*, 1998; Teng *et al.*, 2006). Für Tic110 wurde eine Interaktion mit dem importierten Protein auf stromaler Seite der inneren Membran gezeigt. Es dient vermutlich als eine Art *scaffold* für Faktoren des TIC-Komplexes (Inaba *et al.*, 2003). Allerdings ist Tic110 auch eine mögliche Teilkomponente des Translokationskanals (Balsera *et al.*, 2009). Hsp93 stellt als ATPase vermutlich die nötige Energie durch ATP-Hydrolyse zur Verfügung (Akita *et al.*, 1997). Tic40 dient als Co-Chaperon und koordiniert die Interaktion zwischen dem Vorläuferprotein, Tic110 und Hsp93 (Chou *et al.*, 2006).

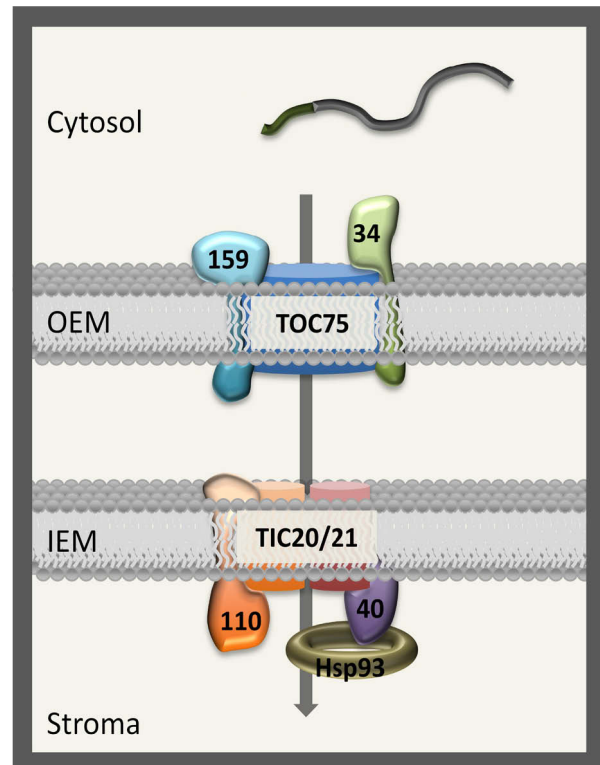


Abbildung 1-4 Importmaschinerie der primären Plastiden

Der Transport über die beiden Membranen der primären Plastide erfolgt über die sogenannten *translocon of the outer/inner membrane of chloroplast* (TOC/TIC). Die Hauptkomponente des TOC bildet Toc75 als eigentliches Translokon. Die bedeutenden Faktoren des TIC Apparates sind Tic 110, 20 und 21. Die Bildung des eigentlichen Translokons ist noch nicht vollständig geklärt. Für den Transport sind noch weitere Faktoren bei beiden Maschinerien notwendig (für eine genauere Beschreibung siehe Text).

Diese Beschreibung der TOC und TIC Komponenten ist als Überblick über die grundsätzlichen Mechanismen dieser Importmaschinerie zu verstehen. Die tatsächlichen Gegebenheiten bzw. Mechanismen stellen sich deutlich komplexer dar. So gibt es weitere Faktoren und die Zusammensetzung der Komplexe kann in Bezug auf Regulation und Art der importierten Proteine variieren (Inaba and Schnell, 2008).

Neben diesem hauptsächlichen Importweg werden immer mehr Proteine identifiziert, die spezialisierte, bisher weitgehend uncharakterisierte Transportwege nutzen. Hier ist vor allem der Import von Proteinen über das Endomembransystem zu nennen. Dieser Importweg

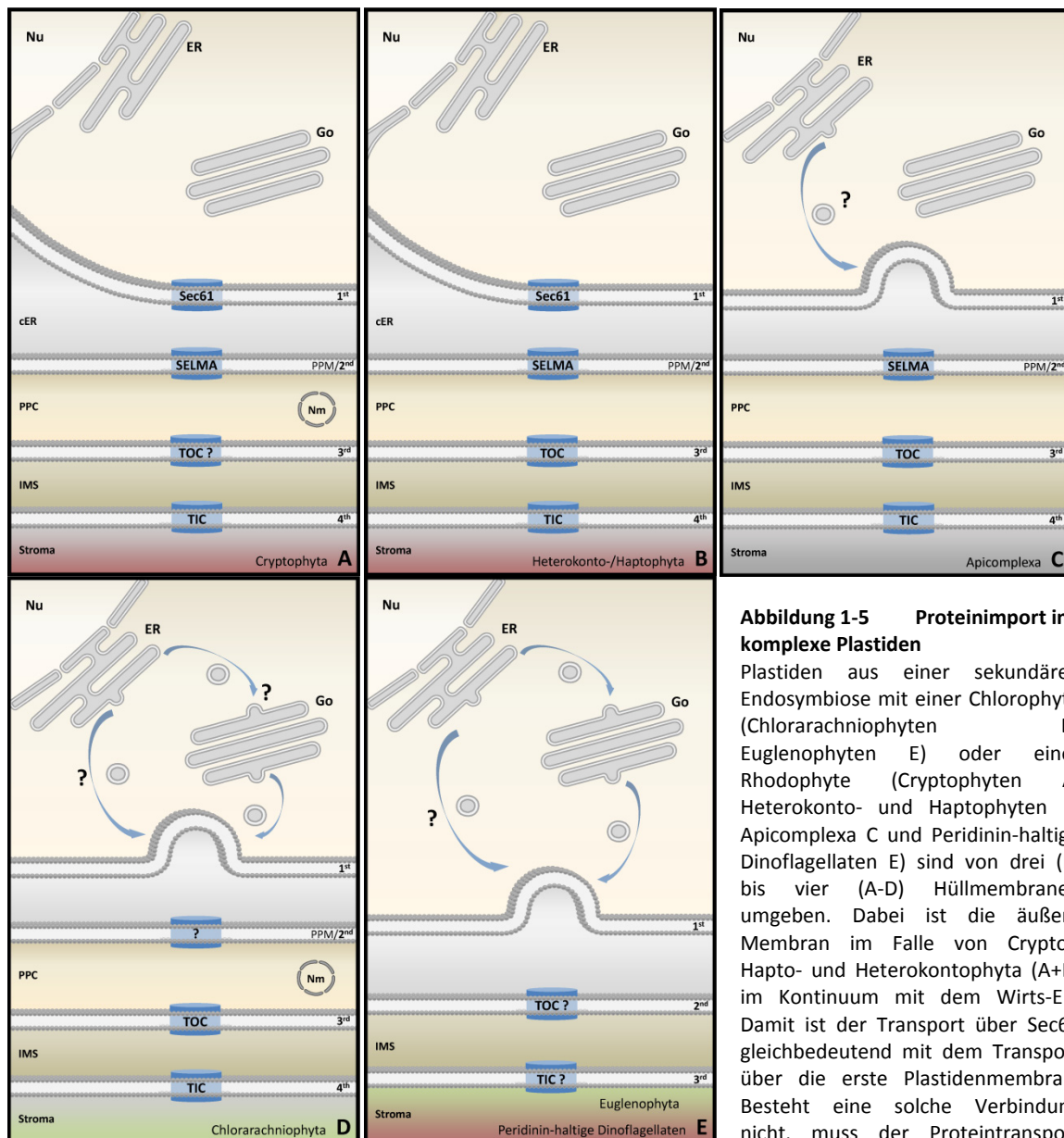
wurde zuerst für eine α -Amylase charakterisiert (Villarejo *et al.*, 2005). In den folgenden Jahren konnten weitere Proteine identifiziert werden, die auf diese Weise in die Plastide gelangen (Nanjo *et al.*, 2006; Kitajima *et al.*, 2009). Die entsprechenden Proteine haben anstatt eines Transitpeptides ein Signalpeptid, welches zunächst den Import in das Endoplasmatische Reticulum (ER) ermöglicht. Der Transport zur Plastide erfolgt dann vesikulär über den Golgi Apparat (Nanjo *et al.*, 2006). Es ist bisher weder geklärt wie der weitere Transport in die Plastide erfolgt, noch welche zusätzlichen Zielsteuerungsinformationen und Mechanismen für einen solchen Import nötig sind.

Im Weiteren haben sich für die Proteine der äußeren Plastidenmembran (*outer envelope protein* - OEP) teilweise eigenständige Importwege entwickelt (Hofmann and Theg, 2005a). Einige OEPs zeichnen sich durch eine N-terminale hydrophobe Domänen aus (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004), bei anderen liegt diese C-terminal (Dhanoa *et al.*, 2010) oder die eigentliche Zielsteuerungssequenz konnte noch nicht vollständig eingegrenzt werden. Je nach Art des OEPs unterscheiden sich auch die beteiligten, jedoch größtenteils unbekannten, Importkanäle bzw. -faktoren. Für viele gilt jedoch eine Beteiligung von TOC75 bei der Insertion als wahrscheinlich (Wallas *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2004; Hofmann and Theg, 2005a).

1.4.2 Sekundäre Plastiden

Die beschriebene evolutionäre Entstehung sekundärer Plastiden und damit verbundener Plastidendiversität führte auch zu unterschiedlichen Importmechanismen für im Nukleus codierte Plastidenproteine. Für den nötigen Importweg ist die Membranarchitektur der Plastide von entscheidender Bedeutung. Trotz der Vielzahl heute zu beobachtender Organisationsvarianten komplexer Plastiden unterliegen die Importwege jedoch einem Grundprinzip.

Im Falle sekundärer Plastiden besitzen nukleus-codierte Plastidenproteine ein *bipartite targeting signal* (BTS). Diese BTS besteht aus einem klassischen Signalpeptid gefolgt von einer Transitpeptid-ähnlichen Sequenz (*transit peptide-like sequence* – TPL; im Weiteren wird diese Sequenz auch als Transitpeptid – TP bezeichnet) (Patron and Waller, 2007).



erfolgen (C-E). Dabei kann der Vesikeltransport direkt vom ER zur Plastide (C) oder über den Golgi (E) stattfinden. Im Falle der Chlorarachniophyten (D) ist der Verlauf des Transports bisher nicht geklärt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass es in Dinoflagellaten vermutlich auch einen Transportweg direkt vom ER zur Plastide gibt (E). Im Falle der Plastiden mit vier Membranen (A-C) erfolgt der weitere Transport über SELMA, TOC und TIC. Für Chlorarachniophyten (D) konnte noch kein Translokton für die zweite Membran identifiziert werden. Für Euglenophyten und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (E) konnten bisher keine TOC und TIC Komponenten identifiziert werden (Grosche *et al.*, 2013).

Dem Aufbau dieser Signalsequenz folgend ist der erste Schritt des Proteinimports in sekundäre Plastiden der co-translationale Import in das ER mittels des Signalpeptids (Bolte *et al.*, 2009). Dies gilt sowohl für sekundäre Plastiden, die ‚innerhalb‘ des Wirt-ERs liegen, als auch für solche die davon unabhängig in der Zelle vorliegen (Plastiden mit drei oder vier Hüllmembranen). Im Falle von Cryptophyten, Heterokontophyten und Haptophyten (komplexe Plastide innerhalb des ER) ist dieser Schritt gleichbedeutend mit dem Transport

über die erste Plastidenmembran (Abbildung 1-5) (Bhaya and Grossman, 1991; Ishida *et al.*, 2000; Wastl and Maier, 2000; Bolte *et al.*, 2009). Für Apicomplexa, Euglenophyten, Chlorarachniophyten und Peridinin-haltige Dinoflagellaten bedeutet dieser Schritt wiederum, dass die Proteine über das Endomembransystem, also über Vesikeltransport, bis zur Plastide transportiert werden müssen (Abbildung 1-5). Dabei können die Vesikel direkt vom ER (Apicomplexa, Dinoflagellaten) oder über den Golgi-Apparat (Euglenophyten, Dinoflagellaten) zur Plastide transportiert werden (Sulli and Schwartzbach, 1995; Nassoury *et al.*, 2003; Sláviková *et al.*, 2005; Tonkin *et al.*, 2006). Im Falle der Chlorarachniophyten ist der finale Ursprung der Transportvesikel noch unbekannt (Hirakawa *et al.*, 2009). Dinoflagellaten scheinen beide Möglichkeiten zu nutzen (Bozarth, 2010), dies wird in dieser Arbeit noch eingehend diskutiert (Punkt 4.2.2).

Für Plastiden mit vier Membranen, abgesehen von Chlorarachniophyten, konnte ein Translokion identifiziert werden, das vermutlich den weiteren Transport über die zweite Plastidenmembran vermittelt (Sommer *et al.*, 2007; Spork *et al.*, 2009; Felsner *et al.*, 2011). Dieses als SELMA (*symbiont specific ERAD-like machinery*) benannte Translokion ist ein vom klassischen ERAD (*ER-associated degradation*) abgeleitetes Translokationssystem (Hempel *et al.*, 2009). Für den Transport über die folgenden Plastidenmembranen konnten dem TOC und TIC System homologe Proteine identifiziert werden. Diese Membranen entsprechen den zwei Hüllmembranen der primären Plastiden. Damit scheint der Transport über die dritte und vierte Membran dem Transport in primäre Plastiden mechanistisch zumindest ähnlich zu sein (Douglas *et al.*, 2001; McFadden and Dooren, 2004; Gilson *et al.*, 2006; van Dooren *et al.*, 2008; Bullmann *et al.*, 2010).

Für Euglenophyten und Dinoflagellaten (mit drei Plastidenmembranen) sind bisher nur unzureichende Genomdaten vorhanden und daher konnten auch für diese Gruppen bisher solche homologen Proteine nicht identifiziert werden. Damit ist über die Transportmechanismen und die genaue Herkunft der verbliebenen Plastidenmembranen dieser Gruppen nur sehr wenig bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass hier andere Transportkonzepte genutzt werden.

1.5 Die BTS der Dinoflagellaten

Peridinin-haltige Dinoflagellaten stellen, wie die Euglenophyten, nicht nur in Hinblick auf ihre Plastide mit drei Hüllmembranen eine Besonderheit dar. In diesen Gruppen weisen die Transitpeptid-ähnlichen Sequenzen weitere Merkmale auf, die sich in anderen Algengruppen nicht identifizieren lassen. Aufgrund dieser Merkmale wurden die Transitpeptide in drei Klassen unterteilt (Vacula *et al.*, 1999; Patron *et al.*, 2005; Durnford and Gray, 2006; Lukeš *et al.*, 2009). Die Benennung dieser Klassen unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen, die beschriebenen Merkmale sind jedoch vergleichbar. Im Weiteren werden die Transitpeptidklassen der Dinoflagellaten genauer beschrieben.

Abbildung 1-6 Klassifizierung der Zielsteuerungssequenzen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die BTS (*bipartite targeting signal*) der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten weist im Vergleich zu anderen Organismen mit komplexer Plastide ‚roten‘ Ursprungs zusätzliche Eigenschaften auf. Aufgrund dieser wurden die Transitpeptide in drei Klassen unterteilt (Patron *et al.*, 2005). Die Klassen I und III weisen C-terminal des Transitpeptids eine hydrophobe Region auf. Diese soll im Falle der Klasse I als Stop-Transfer Domäne (STD) dienen. Bei Klasse III stellt diese eine *thylakoid targeting domain* (TTD) dar und dient vermutlich ebenfalls als STD. Der Klasse II fehlt eine solche zusätzliche Domäne

Bei einigen nukleus-codierten Plastidenproteinen der Dinoflagellaten konnten C-terminal vom Transitpeptid hydrophobe Bereiche identifiziert werden, die nicht Teil des maturen Proteins sind. Nach Patron (Patron *et al.*, 2005) wurden die Transitpeptide der Dinoflagellaten aufgrund dieses Merkmals in die Klassen I, II und III eingeteilt. Klassen I und III umfassen alle Proteine mit hydrophoben Bereich, wobei dieser im Falle von Klasse I Transitpeptiden als Stop-Transfer Domäne (STD) am ER fungieren soll. Es wird angenommen, dass die Proteine der Klasse I im Zuge des co-translationalen Imports in das ER über diese Domäne in der ER-Membran verankert werden. Der mature Teil des Proteins würde dann über die Dauer des Transportes im Cytosol liegen (Nassoury *et al.*, 2003; Patron *et al.*, 2005;

Patron and Waller, 2007). Die hydrophobe Region der Klasse III Transitpeptide zeigt Merkmale einer *thylakoid targeting domain* (TTD), die den Import in das Thylakoidlumen vermittelt. Auch hier wird eine, zumindest teilweise, Funktion als STD diskutiert. Die Transitpeptide der Klasse II zeigen keinen hydrophoben Bereich und liegen nach dem Import in das ER als lösliches Protein im ER-Lumen vor (Patron *et al.*, 2005; Patron and Waller, 2007). Wie oben bereits erwähnt, scheinen diese Klassen auch Einfluss auf den Transportweg zu haben. Bozarth (Bozarth, 2010) hat erste Hinweise darauf gefunden, dass Proteine mit Klasse I Transitpeptiden direkt vom ER zur Plastide transportiert werden, im Gegensatz zu Klasse II und III, die über den Golgi zur Plastide gelangen.

Bozarth untersuchte auch die Zusammensetzung der eigentlichen Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (Bozarth *et al.*, 2012). Hier zeigte sich, dass sie eine deutliche Ladungsseparation aufweisen. So sind die Transitpeptide im N-terminalen Bereich vor allem positiv geladen (basische Aminosäuren) und im C-terminalen Bereich akkumulieren negative Ladungen (saure Aminosäuren). Die Gesamtladung ist zwar, wie für Transitpeptide vieler photosynthetischer Organismen bekannt (Patron and Waller, 2007; Felsner *et al.*, 2010), noch immer positiv, dennoch konnte eine solch deutliche Ladungsverteilung bisher nur bei Dinoflagellaten gezeigt werden. Untersuchungen zu dieser Verteilung sind auch Teil dieser Arbeit.

Bisher ist das Wissen über den Import plastidärer Proteine in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten also äußerst rudimentär. Genaue Kenntnisse über Mechanismen, wie z.B. Rezeptoren, die eine Rekrutierung plastidärer Proteine in Vesikel vermitteln oder die Vorgänge an der zweiten und dritten Plastidenmembran fehlen vollständig.

1.5.1 Dinoflagellaten

Dinoflagellaten sind eine sehr heterogene Gruppe limnischen und marinen Phytoplanktons. Einige Arten können Teil toxischer ‚Roter Tiden‘ sein, andere sind bedeutende Symbionten von Korallen (Pawlowski *et al.*, 2001). Ihre ökologische und ökonomische Bedeutung wird aber auch durch ihren Anteil von 20 – 25% an der marinen Primärproduktion deutlich (Schnepf and Elbrächter, 1999). Dabei sind nur 50% der Dinoflagellaten photosynthetisch aktiv. Den Großteil dieser photosynthetisch aktiven Dinoflagellaten stellen die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (Taylor, 1990). Diese biflagellierten Alveolaten haben Peridinin als

Hauptcarotenoid und ihre komplexe Plastide ist, wie oben beschrieben, von drei Membranen umgeben.

Studien an Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wurden in dieser Arbeit an *Amphidinium carterae* Hulburt (Hulburt, 1957) (Ordnung Gymnodiales) durchgeführt. Die Ordnung Gymnodiales, und damit auch *A. carterae*, gehört zu den Kern-Dinoflagellaten bzw. Dinokaryoten (Hoppenrath and Leander, 2010).

Neben den genannten Merkmalen (drei Plastidenmembranen, *minicircle*, BTS) zeichnen sich Dinoflagellaten durch weitere Besonderheiten aus. Dinoflagellaten gehören zu den Eukaryoten mit den größten Genomen. Die errechneten Größen reichen dabei von 1,5 Gb bei *Symbiodinium* (LaJeunesse *et al.*, 2005) bis zu 185 Gb bei *Lingulodinium polyedrum* (Spector, 1984). Zusätzlich liegen ihre Chromosomen stetig kondensiert, in flüssig-kristalliner Form vor, wobei typische Nukleosomen jedoch fehlen (Bodansky *et al.*, 1979; Gautier *et al.*, 1986; Bouligand and Norris, 2001; Chow *et al.*, 2010). Viele Gene liegen zudem in repetitiver Tandemanordnung vor (Liu and Hastings, 2006; Bachvaroff and Place, 2008) und werden als solche auch transkribiert (Bachvaroff and Place, 2008) und erst durch ein 5'-*trans*-splicing eines sogenannten *spliced leaders* zur endgültigen mRNA maturiert (Lidie and van Dolah, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

Die oben genannten Eigenschaften sind auch Gründe dafür, dass bis heute noch kein Dinoflagellatengenom sequenziert wurde. Die beschriebenen Merkmale zeigen jedoch auch, dass Dinoflagellaten außergewöhnliche Organismen darstellen, mit Hilfe derer viele Fragen in Bezug auf Genomreduzierung, Gentransfer und die Evolution der komplexen Plastide beantwortet werden könnten.

2 Zielsetzung

Thema dieser Arbeit sind die Evolution der plastidären RNA-Edierung in Landpflanzen und die Genomorganisation, sowie der plastidäre Proteinimport der komplexen Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.

Die plastidäre RNA-Edierung ist ein unter Landpflanzen weit verbreiteter Prozess. Allerdings variiert die Anzahl der Edierungsstellen zwischen den verschiedenen Arten und besonders den verschiedenen Klassen der Landpflanzen. Besonders die Entdeckung, dass in dem Lebermoos *M. polymorpha* keine RNA-Edierung stattfindet, belebte auch die Diskussion über die Entstehung der plastidären RNA-Edierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen, auf Grundlage der vollständigen Sequenzierung des Plastoms, der plastidäre Editotyp des Lebermooses *Pellia endiviifolia* bestimmt werden. Ziel war eine Einordnung dieses Editotypen in evolutionärer Hinsicht um somit weitere Einblicke in die Herkunft und Evolution der plastidären RNA-Edierung in Landpflanzen zu gewinnen.

Zum anderen sollten Untersuchungen zur Genomstruktur und dem Proteinimport der komplexen Plastide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten durchgeführt werden. Diese ökologisch bedeutenden Organismen sind nach bisherigen Erkenntnissen aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hervorgegangen. Im Gegensatz zu Organismen mit einer vergleichbaren Entstehungsgeschichte weisen sie jedoch einige Besonderheiten in Bezug auf ihre Plastide auf. Das Plastom der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ist äußerst reduziert und ist in sogenannten *minicircles* organisiert. Für die nähere Untersuchung der plastidären Genomstruktur sollten mittels einer neuen Methodik *minicircles* aus dem Peridinin-haltigen Dinoflagellat *Amphidinium carterae* isoliert und analysiert werden.

Die Plastide dieser Organismen ist zusätzlich nur von drei Membranen umgeben und dies scheint Einfluss auf die Organisation des plastidären Proteinimports zu haben. Da Peridinin-haltige Dinoflagellaten bisher nicht transfizierbar sind, sollten in dieser Arbeit zunächst die Zielsteuerungssignale, die den Import in die Plastide vermitteln, genauer charakterisiert werden. Auf Grundlage dieser Untersuchung erfolgten dann Studien zum plastidären Proteinimport im heterologen und homologen System. Die gewonnenen Ergebnisse sollten als Grundlage für eine evolutionäre Betrachtung der Entstehung der komplexen Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und ihrer Proteinimportmechanismen dienen.

3 Ergebnisse

3.1 Plastidengenom und plastidäre RNA-Edierung in *Pellia endiviifolia*

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung des plastidären Editotyps des Lebermooses *P. endiviifolia*. In diesem Zusammenhang wurde jedoch auch die vollständige Sequenz des Plastoms erstmalig bestimmt (in Zusammenarbeit mit Stefan Zauner und Helena Funk). Deswegen werden hier zunächst die erhaltenen Daten zur Sequenzierung des Plastidengenoms gezeigt und im Anschluss daran wird auf die Ergebnisse für die plastidäre RNA-Edierung eingegangen.

3.1.1 Das Plastom

Als Grundlage für die Sequenzierung des Plastidengenoms von *P. endiviifolia* diene das Plastidengenom von *M. polymorpha*. Auf dessen Sequenz aufbauend, wurden die initialen Primer für die *long range* PCRs abgeleitet. Davon ausgehend erfolgte die Sequenzierung jeweils unter doppelter, unabhängiger Abdeckung.

Das Plastidengenom umfasst 120,556 bp (Abbildung 3-1). Es codiert für 90 Proteine (inklusive *ycfs*), 4 rRNAs und 30 tRNAs (Abbildung 3-1). Weiterhin zeigt der generelle Aufbau die bekannte Aufteilung in LSC, SSC und IR_{A/B} und ist in großen Teilen übereinstimmend mit den bisher bekannten Plastomen der Lebermoose *P. pulcherrimum* (Forrest, 2011) und *M. polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986). Diese Konservierung bezieht sich sowohl auf Genanordnung und Gengehalt als auch auf die Grenzen zwischen LSC, SSC und IR_{A/B}. Die *inverted repeats* haben eine Länge von 9091 bp (*trnV*-GAC – *trnN*-GUU) und umfassen ausschließlich rRNAs und tRNAs. Auch die Lage der Introns ist innerhalb der Lebermoose, soweit bekannt, konserviert. Hiervon ist jedoch *ycf3* ausgenommen. Im Vergleich zu *P. endiviifolia* und *P. pulcherrimum* fehlt in *M. polymorpha* ein Intron. Der A/T-Gehalt (Tabelle 3-1) ist bei *P. endiviifolia* (64,11%) geringer als bei *P. pulcherrimum* (66,77%) und *M. polymorpha* (71,19%).

Unterschiede zu *M. polymorpha* zeigen sich vor allem in kleineren Insertionen bzw. Deletionen, die primär in intergenischen Bereichen zu finden sind. Allerdings ist auch im codierenden Bereich von *ycf2* in *P. endiviifolia* eine Deletion von ca. 550bp vorhanden, weitere kleinere Deletionen können zudem in *ycf1-1* detektiert werden.

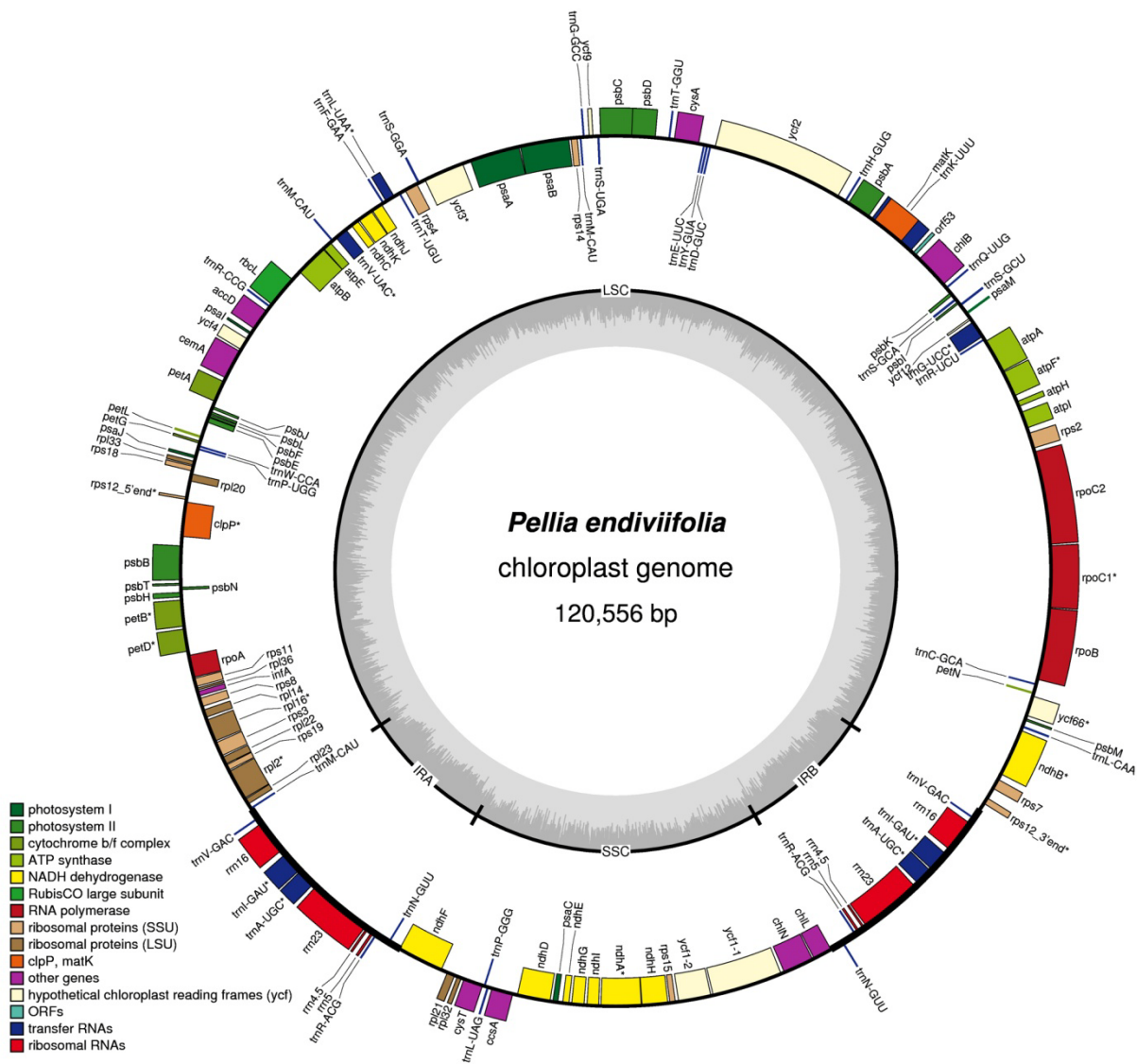


Abbildung 3-1 Plastidäres Genom des Lebermooses *Pellia endiviifolia*

Die Abbildung zeigt die Genomkarte des Plastidengenoms des Lebermoos *Pellia endiviifolia*. Die unterschiedlichen Gengruppen sind farblich markiert (siehe Legende), *Gene mit Intron. Im inneren Kreis ist der G/C- (dunkles grau) bzw. A/T-Gehalt grafisch dargestellt (Grosche et al., 2012).

Im Bereich des Gens *ycf1* (*ycf1-1*, *ycf1-2*) ist ein weiterer Unterschied zu erkennen. Für *M. polymorpha* sind hier zwei verschiedene *orfs* annotiert (*orf1068*, *orf464*), für *P. pulcherrimum* jedoch mit *ycf1* nur einer, der dem *orf1068* aus *M. polymorpha* entspricht. Das von der Plastomstruktur vergleichbare *Physcomitrella patens* (Sugiura et al., 2003) und auch die meisten Spermatophyta (Drescher et al., 2000) hingegen zeigen hier einen

zusammenhängenden *orf* (*ycf1*). Die Funktion des codierten Proteins ist bisher unbekannt, da dieses Gen aber essentiell zu sein scheint (Drescher *et al.*, 2000), wurden die dieser Region entsprechenden *orfs* hier als *ycf1-1* und *ycf1-2* bezeichnet. Generell weisen alle *ycfs* eine relativ geringe Konservierung auch schon innerhalb der Lebermoose auf.

Weitere Unterschiede konnten in den *inverted repeats* identifiziert werden. So sind diese in *P. endiviifolia* kompakter im Vergleich mit *M. polymorpha*.

Region	Beginn- Ende	Länge [bp]	A/T - Gehalt
LSC	1 - 82510	82510	66,05%
SSC	91601 - 111456	19855	66,97%
IR_A	82510 - 91601	9091	52,14%
IR_B	111456 - 120547	9091	52,14%
gesamtes Genom		120547	64,11%
codierender Bereich			
Protein		73257	64,33%
t-/rRNAs		11922	46,19%
Gesamt		85179	61,79%
<i>P. pulcherrimum</i>		119007	66,77%
<i>M. polymorpha</i>		121025	71,19%

Tabelle 3-1 Kenndaten des Plastoms von *P. endiviifolia*

Die Tabelle gibt die Längen der LSC, SSC und von den IR_{A/B} an. Für jeden Bereich und die codierenden Bereiche (Protein, t-/rRNA, Gesamt) ist auch der jeweilige A/T-Gehalt angegeben. Weiterhin sind als Vergleich die Daten für die Plastome von *M. polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986) und *P. pulcherrimum* (Forrest, 2011) gezeigt (Grosche *et al.*, 2012).

Im Zuge der vollständigen Sequenzierung des Plastidengenoms wurden für die 3'-Region des Gens *cysT* (*orf288* in *M. polymorpha*) voneinander abweichende Sequenzen ermittelt. Hier zeigt das Plastidengenom also eine gewisse Varianz. Es besteht die Möglichkeit, dass das Plastidengenom, wie bereits für andere Plastome beschrieben (Oldenburg and Bendich, 2004), nicht ausschließlich zirkulär vorliegt. Damit wäre diese Region ein möglicher Punkt an dem ein Wechsel zur linearen Form stattfindet.

3.1.2 Der plastidäre Editotyp

Die Bestimmung der Edierungsstellen erfolgte durch Sequenzvergleich zwischen Transkripten der zuvor ermittelten genomischen DNA Sequenz. Die Gene wurden mit Hilfe des ORF-Finder (NCBI) und unter Abgleich mit den Daten zu *M. polymorpha* aus der NCBI-

Datenbank identifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass möglichst der gesamten codierende Bereich des Gens abgedeckt wurde. Zumeist erfolgte eine direkte Sequenzierung des PCR-Amplifikats von mindestens zwei unabhängigen RNA-Isolationen und damit auch cDNA-Synthesen und PCRs. In einigen Fällen musste auf Klonierung in einen Zwischenvektor (pJet) zurückgegriffen werden. Dabei wurde auf eine höhere Abdeckungsanzahl geachtet. Edierungsstellen wurden nur für Protein-codierende Bereiche überprüft.

Bis auf *ycf66* konnten alle erwarteten Gene amplifiziert und analysiert werden. Im Falle von *ycf66* konnte trotz zahlreicher Versuche kein Amplifikat erhalten werden. Dies könnte auf eine transkriptionelle Inaktivität hindeuten. Ob diese Inaktivität generell oder nur aufgrund der Kulturbedingungen besteht, ist unbekannt.

Die Anzahl aller identifizierten Edierungsstellen liegt bei 54. Es wurden ausschließlich C→U Transitionen beobachtet. Die Gene mit ihrer jeweiligen Anzahl an beobachteten Edierungen und deren entsprechende Nukleotid- und Aminosäureposition sind in Tabelle 3-3 aufgeführt. Die Edierungsstellen werden in einem Code als vereinheitlichte Nomenklatur angegeben (Rüdinger *et al.*, 2009):

Gencode e *Edierungstyp* (C→U =U) *Nt-Position* *result*. *AS-Austausch* (Beispiel: atpFeU113PL)

In 26 der 90 Protein-codierenden Gene konnte Edierung gezeigt werden. Betroffen sind vor allem die Genfamilien *ndh*, *pet*, *psa/psb* und *atp*. Zwei Edierungen führen zur Wiederherstellung eines Startcodons (*ccsAeU2TM* und *rpl23eU2TM*). Weiterhin sind drei Edierungsstellen nur partiell ediert (*ndhFeU566SL*, *petAeU308PL*, *psbJeU60LL*) und zwei sind *silent* (*clpPeU81LL*, *psbJeU60LL*), das

heißt, dass aus ihnen kein

Aminosäureaustausch resultiert. Dabei

ist die Edierungsstelle *psbJeU60LL*

sowohl partiell ediert als auch *silent*.

Nt im Codon	1	2	3
Anzahl	8	44	2

Tabelle 3-2 Verteilung der Edierungen auf Nukleotidpositionen im Codon

Die Tabelle zeigt welche Nukleotidposition im Codon bei den 54 Edierungen betroffen ist.

Die Edierungen führen jedoch meist zum Austausch der codierten Aminosäure. Dies ist auch abhängig von der Position des edierten Cytidins im Codon. Tabelle 3-2 zeigt die Verteilung auf die drei Positionen im Codon. Es wird deutlich, dass zumeist auf der zweiten Codonposition ediert wird (44), gefolgt von der ersten (8). Edierungen auf der dritten Codonposition haben meistens keinen Effekt auf die codierte Aminosäure. Die zwei hier beobachteten Edierungen auf dritter Position stellen somit auch die *silent* Edierungsstellen dar.

Gen	Anzahl Edierungen	Nt Position	AS Position	Codon	Kontext	Code	Bemerkung
atpB	1	1097	366	tCg	S-->L	atpBeU1097SL	
atpF	1	113	38	cCa	P-->L	atpFeU113PL	
atpH	2	188	63	tCa	S-->L	atpHeU188SL	
		224	75	cCg	P-->L	atpHeU224PL	
atpI	4	292	98	Ctt	tCtt	L-->F	atpIeU292LF
		431	144	tCt	S-->F	atpIeU431PL	
		632	211	cCa	P-->L	atpIeU632PL	
		704	235	cCa	P-->L	atpIeU704PL	
ccsA	3	2	1	aCg	T-->M	ccsAeU2TM	Startcodon
		403	135	Cgg	cCgg	R-->W	ccsAeU403RW
		482	161	cCt	P-->L	ccsAeU482PL	
clpP	3	81	27	ctC	ctCt	L	clpPeU81LL
		320	107	tCa	S-->L	clpPeU320SL	
		533	178	tCt	S-->F	clpPeU533SF	
ndhB	1	1427	476	tCt	S-->F	ndhBeU1427SF	
ndhD	5	536	179	tCa	S-->L	ndhDeU536SL	
		548	183	tCa	S-->L	ndhDeU548SL	
		824	275	cCa	P-->L	ndhDeU824PL	
		1037	346	tCt	S-->F	ndhDeU1037SF	
		1324	442	Cat	tCat	H-->Y	ndhDeU1324HY
ndhE	1	242	81	tCa	S-->L	ndhEeU242SL	
ndhF	5	566	187	tCa	S-->L	ndhFeU566SL	partiell
		581	194	tCa	S-->L	ndhFeU581SL	
		1067	356	tCa	S-->L	ndhFeU1067SL	
		2072	691	tCt	S-->F	ndhFeU2072SF	
		2078	693	cCa	P-->L	ndhFeU2078PL	
ndhG	1	133	45	Cgt	tCgt	R-->C	ndhGeU133RC
ndhK	1	56	19	tCa	S-->L	ndhKeU56SL	
petA	3	308	103	cCa	P-->L	petAeU308PL	partiell
		311	104	tCa	S-->L	petAeU311SL	
		748	250	Ccg	tCcg	P-->L	petAeU748PL
petB	3	167	56	tCc	S-->F	petBeU167SF	
		506	169	tCa	S-->L	petBeU506SL	
		593	198	tCt	S-->F	petBeU593SF	
petG	1	80	27	tCg	S-->L	petGeU80SL	
petL	2	23	8	tCt	S-->F	petLeU23SF	
		74	25	tCa	S-->L	petLeU74SL	
petN	1	86	29	tCg	S-->L	petNeU86SL	
psaB	3	764	255	cCa	P-->L	psaBeU764PL	
		782	261	tCt	S-->F	psaBeU782SF	
		1595	532	cCa	P-->L	psaBeU1595PL	
psbB	2	448	150	Cgt	tCgt	R-->C	psbBeU448RC
		740	247	tCc	S-->F	psbBeU740SF	
psbC	1	859	287	tCg	S-->L	psbCeU859RC	
psbJ	1	60	20	ctC	ctCg	L	psbJeU60LL
psbM	2	41	14	tCt	S-->F	psbMeU41SF	
		47	16	tCa	S-->L	psbMeU47SL	
rpl23	2	2	1	aCg	T-->M	rpl23eU2TM	Startcodon
		127	43	Ctt	tCtt	L-->F	rpl23eU127LF
rpoB	3	863	288	tCa	S-->L	rpoBeU863SL	
		1414	472	Cat	tCat	H-->Y	rpoBeU1414HY
		1940	647	tCa	S-->L	rpoBeU1940SL	
rpoC2	1	290	97	cCt	P-->L	rpoC2eU290PL	
ycf3	1	65	22	cCg	P-->L	ycf3eU65PL	
Gesamt	54						

Tabelle 3-3 Übersicht aller edierten Gene des Plastoms von *P. endiviifolia*

Die Tabelle zeigt alle für das Plastidengenom von *P. endiviifolia* identifizierten Edierungsstellen unter Angabe der betroffenen Nukleotid- bzw. Aminosäureposition mit Bezug auf das Gen. Zusätzlich sind Codon bzw. der Sequenzkontext und der resultierende Aminosäureaustausch angegeben. Eine dunkle Schattierung steht für einen tCa-Kontext der Edierungsstelle, die hellere zeigt einen tCn- oder nCa-Kontext an. Der Code ist die vereinheitlichte Form für die Angabe von Edierungen (Rüdinger *et al.*, 2009). Nt – Nukleotid, AS – Aminosäure (Grosche *et al.*, 2012).

Die resultierenden Aminosäureaustausche sind in Abbildung 3-2 festgehalten. Die häufigsten

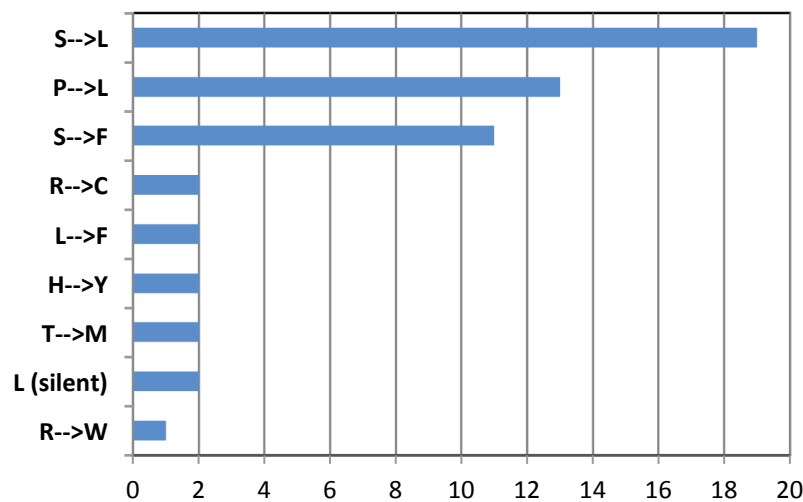


Abbildung 3-2 Aus der plastidären RNA-Edierung in *P. endiviifolia* resultierender Austausch von Aminosäuren

Die identifizierten, plastidären RNA-Edierungen aus *P. endiviifolia* führen vor allem zum Austausch von Serin zu Leucin oder Phenylalanin oder von Prolin zu Leucin. In zwei Fällen wird ein Startcodon wiederhergestellt (T→M). Zwei weitere Edierungen führen zu keinem Austausch der codierten Aminosäure, sie sind *silent* (L→L).

Austausche sind Serin→Leucin (19), Prolin→Leucin (13) und Serin→Phenylalanin (11). Damit wird deutlich, dass die Edierungen Einfluss auf das jeweils codierte Protein haben, da sie zu Codons führen, die für Aminosäuren mit deutlich abweichenden bio-chemischen Eigenschaften codieren.

Im Hinblick auf die evolutionäre Entstehung und Entwicklung der plastidären RNA-Edierung ist auch der Sequenzkontext der Edierungsstelle von Bedeutung. Betrachtet man die identifizierten Edierungsstellen unabhängig vom Codonkontext, also die direkt umgebenden Nukleotide der Edierungsstelle, so zeigt sich eine weitere Tendenz.

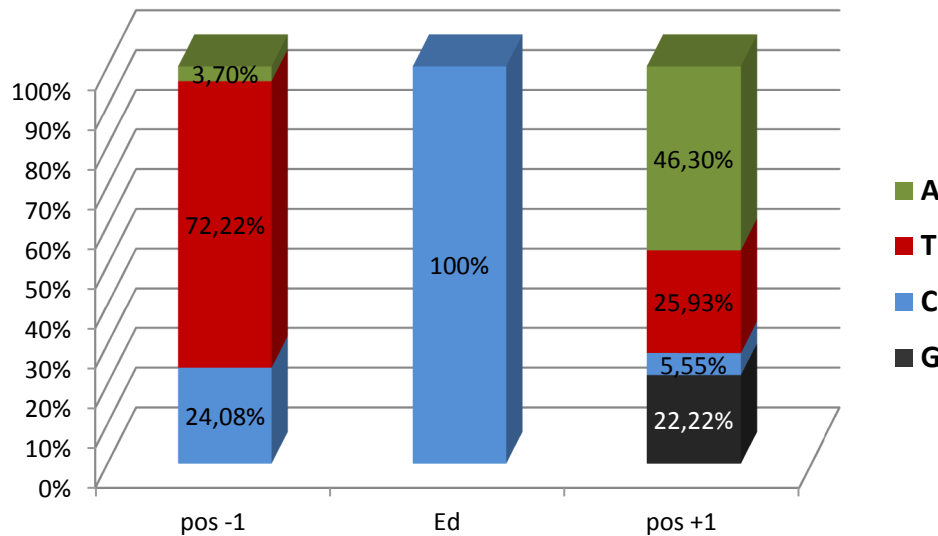


Abbildung 3-3 Codon-unabhängiger Sequenzkontext der plastidären RNA-Edierung in *P. endiviifolia*
 Die Abbildung zeigt den direkten Sequenzkontext der identifizierten, plastidären RNA-Edierungen aus *P. endiviifolia*. Dabei bezeichnet ‚Ed‘ die eigentliche Edierungsstelle und ‚pos-1‘ das *upstream* und ‚pos+1‘ das *downstream* gelegene Nukleotid. In 72,22% aller Edierungen ist ein Thymidin *upstream* und zu 46,30% ein Adenosin *downstream*. Dies stellt einen Sequenzkontext mit geringer C→T Mutationsrate dar.

Wie aus Abbildung 3-3 zu entnehmen ist, liegen fast ausschließlich Nukleotide mit Pyrimidinbase (T, C) 5′ vor der Edierungsstelle (Ed), also auf der Position-1 (pos-1) (ca. 96%). Im Gegensatz dazu liegen 3′ von der eigentlichen Edierung, Position+1 (pos+1), hauptsächlich Nukleotide mit Purinbase (A, G) (ca. zu 69%). Vor allem sind Thymidine an pos-1 (72%) und Adenine an pos+1 (46%) zu beobachten. Insgesamt 17 Edierungsstellen in *P. endiviifolia* liegen in einem kompletten T_A-Kontext (ca. 32%).

3.2 Genetische Kompartimentierung in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Dinoflagellaten weisen im Vergleich zu anderen photosynthetischen Eukaryoten in ihrer genomischen Kompartimentierung einige Besonderheiten auf. Ihre mitochondriellen und plastidären Genome scheinen sehr weit reduziert zu sein (Zhang *et al.*, 1999b; Nash *et al.*, 2007; Howe *et al.*, 2008) und der Großteil ihrer Gene codiert bereits im Nukleus (Hackett *et al.*, 2004). Das verbliebene plastidäre Genom ist in sogenannten *minicircles* organisiert.

3.2.1 *Minicircles* in *A. carterae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *minicircles* aus dem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *A.*

Name	Länge [bp]	codiert
AC T1	2492	-
AC T2*	1296	-
AC T3	2343	<i>psbA</i>
AC T4	2677	23S
AC T5	2666	23S
AC T6	2261	-
AC T7	2496	<i>petD</i>
AC T8	2510	-
AC T9	2696	23S
AC T10	2031	-
AC T11	2704	23S
AC T12	2255	<i>psbB</i>
AC T13	2364	<i>psbD/psbE/psbI</i>
AC T14	2676	-
AC T15	2336	<i>petD</i>
AC T16	2033	-
AC T17	2029	-
AC T18	1868	-

Tabelle 3-4 Übersicht der über Transposonmutagenese isolierten *minicircles* aus *A. carterae*

Aus dem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *A. carterae* wurden *minicircles* mittels einer Transposonmutagenese isoliert und sequenziert. Die Tabelle zeigt die identifizierten *minicircles* unter Angabe der Länge (in bp) und den codierten Genen (sofern vorhanden). *Für ACT2 lag eine Doppelinsertion vor.

carterae mit Hilfe einer *in vitro* Transposonmutagenese isoliert. Das verwendete Transposon enthielt einen bakteriellen *origin of replication (ori)* für die Replikation in *E. coli* und eine Kanamycin-Resistenzkassette für die Selektion positiver Klone. Dieses System ermöglicht es, die *minicircles* nach Isolation mit dem Transposon zu mutagenisieren und *E. coli* damit zu transformieren. Danach können die *minicircles* wie normale Plasmide in hoher Kopienzahl isoliert und sequenziert werden.

Auf diese Weise konnten bisher 17 *minicircles* aus *A. carterae* isoliert werden. Der ursprünglich als AC T2 bezeichnete *minicircle* wurde verworfen, da eine Doppelinsertion des Transposons

stattgefunden hat. Alle isolierten *minicircles* sind mit eventuell codierten Genen in Tabelle 3-4 aufgeführt, ihre vollständigen Sequenzen sind im Anhang (9-3) einzusehen. Die Größen reichen von 1868bp (AC T18) bis zu 2704bp (AC T11) und entsprechen damit den zu erwartenden Größen für *A. carterae* (Howe *et al.*, 2008).

Insgesamt wurden vor allem nicht codierende *minicircles* (8) isoliert. Weiterhin wurden *minicircles* identifiziert, die für die 23SrRNA (4), *petD* (2) und, jeweils einmal, für *psbA*, *psbB* bzw. *psbD/E/I* codieren. Unter den hier isolierten *minicircles* konnten keine identifiziert werden, die sich in ihrer Sequenz vollkommen gleichen (Tabelle 3-5). Die *minicircles* AC T7 und AC T15 sind jedoch zu 89% identisch. Auch die *circles* 1, 8, 14 und 16 weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, ebenso die *minicircles*, die für die 23SrRNA codieren (4, 5, 9, 11).

	AC T1	AC T3	AC T4	AC T5	AC T6	AC T7	AC T8	AC T9	AC T10	AC T11	AC T12	AC T13	AC T14	AC T15	AC T16	AC T17	AC T18
AC T1	100	8	12	11	14	8	78	13	14	13	7	8	98	8	81	14	7
AC T3	8	100	11	10	12	10	7	11	15	9	5	11	8	9	8	17	11
AC T4	12	11	100	98	14	6	8	98	18	93	8	8	12	5	13	18	5
AC T5	11	10	98	100	14	6	8	98	16	94	8	8	12	5	13	16	6
AC T6	14	12	14	14	100	6	11	17	31	17	5	8	16	6	16	31	9
AC T7	8	10	6	6	6	100	7	6	11	6	2	8	9	89	7	11	10
AC T8	78	7	8	8	11	7	100	8	9	8	6	7	98	7	65	9	7
AC T9	13	11	98	98	17	6	8	100	17	93	8	8	12	5	13	17	5
AC T10	14	15	18	16	31	11	9	17	100	21	6	15	22	13	23	98	12
AC T11	13	9	93	94	17	6	8	93	21	100	8	8	13	5	13	16	6
AC T12	7	5	8	8	5	2	6	8	6	8	100	4	7	1	7	6	12
AC T13	8	11	8	8	8	8	7	8	15	8	4	100	9	7	8	11	11
AC T14	98	8	12	12	16	9	98	12	22	13	7	9	100	7	76	16	7
AC T15	8	9	5	5	6	89	7	5	13	5	1	7	7	100	8	10	11
AC T16	81	8	13	13	16	7	65	13	23	13	7	8	76	8	100	23	9
AC T17	14	17	18	16	31	11	9	17	98	16	6	11	16	10	23	100	13
AC T18	7	11	5	6	9	10	7	5	12	6	12	11	11	11	9	13	100

Tabelle 3-5 Grad der Sequenzähnlichkeit isolierter *minicircles* zueinander

Die Kreuztabelle gibt die Sequenzähnlichkeit der isolierten *minicircles* zueinander an (Angabe in %). Zur Ermittlung dieser Prozentzahlen wurden die *minicircles* über blastn miteinander verglichen. Ähnlichkeiten ab 70% sind in hellgrau, ab 90% in dunkelgrau unterlegt.

Erkennbare Unterschiede sind vor allem kleinere Insertionen bzw. Deletionen, die auch in der codierenden Region der 23SrRNA *minicircles* zu beobachten sind.

Beim Abgleich aller vorliegenden *minicircles* (hier wurden die zuvor in der Diplomarbeit (Grosche, 2009) bestimmten *circles* *atpA* und *atpB* hinzugezogen) konnte eine ca. 60 bp lange Region, die allen *minicircles* gemein ist, identifiziert werden (Abbildung 3-4). Dieser Bereich bildet vermutlich die für minicircle bekannte *core*-Region (Zhang *et al.*, 2002) und wird im Weiteren als *core-min* bezeichnet. Dies bedeutet, dass er die minimale *core*-Region darstellt. Wie aus dem *Alignment* in Abbildung 3-4 zu ersehen ist, sind auch die den *core-min* flankierenden Bereiche teilweise unter den *minicircles* konserviert. Dabei scheinen die *minicircles* durch die Merkmale dieser flankierenden Regionen Untergruppen zu bilden. Dieser als *core-ext* bezeichnete Bereich umfasst dann insgesamt ca. 180 bp. Zusätzlich zu dieser potentiellen *core*-Region zeigen die *minicircles* eine Vielzahl von *direct* und *inverted repeats*, die zum Teil auf mehreren *circles* identifizierbar sind.

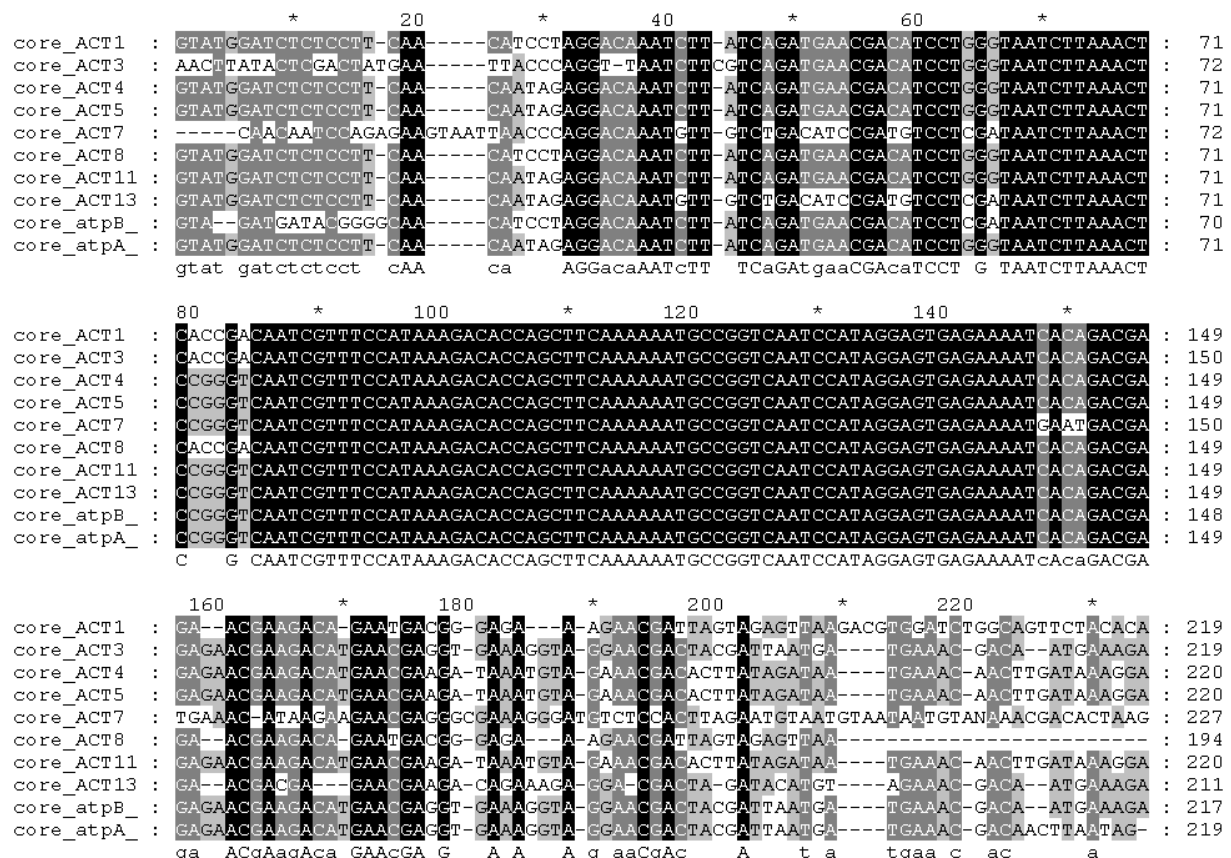


Abbildung 3-4 Alignment der *core* Region ausgewählter *minicircles* aus *A. carterae*

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten *minicircles* zeigen eine von bisher bekannten *minicircles* von *A. carterae* abweichende *core*-Region (Hiller, 2001; Barbrook *et al.*, 2006). Der, hier so benannte, *core-min* umfasst eine Region von 60 bp und ist unter allen isolierten *minicircles* konserviert. Darüber hinaus zeigen auch die den *core-min* umgebenden Regionen einen gewissen Grad an Konservierung. Dieser *core-ext* bezeichnete Bereich ist zwischen den verschiedenen *minicircles* unterschiedlich stark konserviert.

3.3 Plastidärer Proteinimport in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Aufgrund ihrer Membranarchitektur mit drei Membranen stellt die komplexe Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten in der 'roten Linie' eine Ausnahme dar. Durch fehlende Genomdaten und schlechte experimentelle Zugänglichkeit ist das Wissen über die Mechanismen des Proteinimports in die Plastide stark eingeschränkt. Bisherige Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Transportmechanismen, trotz des Verlusts einer Membran, im Vergleich zu den übrigen Chromalveolaten, durchaus komplex sind. Dies bezieht sich sowohl auf die für den Transport notwendigen Signalsequenzen als auch auf die Transportwege in der Zelle.

3.3.1 Untersuchung der Transitpeptide Peridinin-haltiger Dinoflagellaten im heterologen System

Die Zielsteuerungssequenz Nukleus-codierter Plastidenproteine ist wie beschrieben zweiteilig. Diese BTS ist aus Signalpeptid und Transitpeptid zusammengesetzt. Weiterhin wurden die Transitpeptide aufgrund ihrer zusätzlichen Eigenschaften (Transmembrandomäne, Thylakoidimportdomäne) in drei unterschiedliche Klassen unterteilt (Patron *et al.*, 2005).

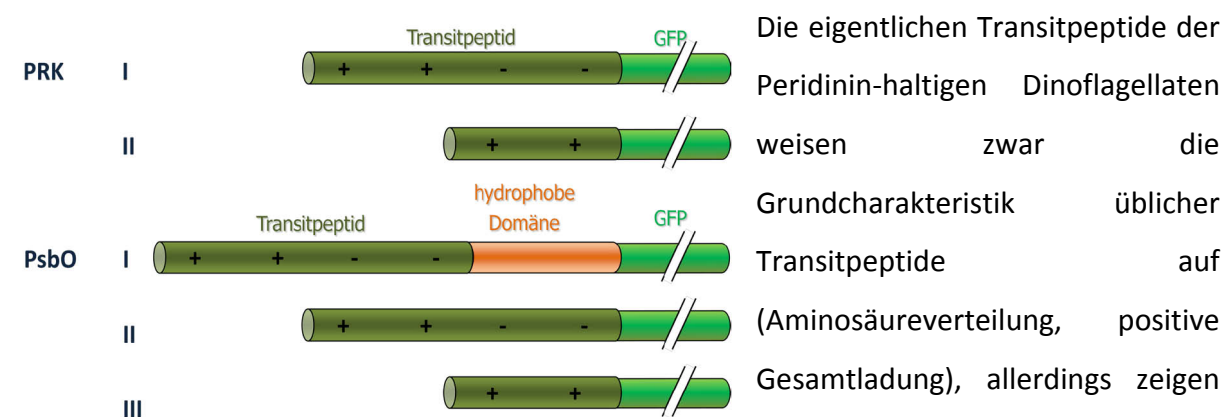


Abbildung 3-5 Konstrukte für die Lokalisation in *A. thaliana* Protoplasten

Die Transitpeptide der Proteine Prk und PsbO wurden an GFP fusioniert und schrittweise die hydrophobe Domäne (PsbO) und der negativ geladene Teil des Transitpeptids (Prk, PsbO) deletiert. *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten wurden mit diesen Konstrukten mit Hilfe des pAVA Vektors transfiziert.

terminalen Bereich und negative Ladungen auf den C-terminalen Bereich des Transitpeptids

verteilen. Den Transitpeptiden der Landpflanzen dagegen fehlt eine solche Ladungsverteilung (Bozarth *et al.*, 2012).

Ältere Studien zeigten die Funktionalität von Transitpeptiden der Dinoflagellaten an isolierten Chloroplasten *in vitro* (Chaal and Green, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalität der Transitpeptide Nukleus-codierter Proteine in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana*, also *in vivo*, überprüft.

Dazu wurden exemplarisch die dem Signalpeptid folgenden Transitpeptide der Phosphoribulosekinase (Prk) und des *oxygen evolving complex* (PsbO) ausgewählt, da sie die charakteristische Ladungsverteilung aufweisen und den Transitpeptidklassen II bzw. III angehören. Diese Transitpeptide und ein Teil des maturen Proteins wurden N-terminal an GFP fusioniert und die Importkompetenz des Fusionsproteins in *A. thaliana* überprüft. Zusätzlich wurde die Transitpeptide um den negativen Bereich verkürzt und beobachtet, ob dies einen Effekt auf den Import in primäre (grüne) Plastiden hat. Durch die Verkürzung werden die Transitpeptide, bezogen auf die Ladungsverteilung, denen der Landpflanzen deutlich ähnlicher. Die schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abbildung 3-5 zu sehen. Da es sich bei PsbO um ein Klasse III Transitpeptid handelt, wurde hier auch eine verkürzte Version ohne die TTD getestet.

In Abbildung 3-7 zeigt die Analyse der Protoplasten mit dem KLSM. Als Positivkontrolle diente das Transitpeptid von PsbO aus *Pisum sativum*. Abbildung 3-7 (P.s. PsbO) zeigt, dass das Transitpeptid aus *P. sativum* den plastidären Import in *A. thaliana* vermitteln kann. GFP ohne fusioniertes Transitpeptid diente als Negativkontrolle. Abbildung 3-7 (GFP) zeigt die

deutlich eine Lokalisation im Cytosol.

Die Lokalisationen für die Konstrukte von Prk und für PsbO sind in Abbildung 3-7 (PRK I-II/PsbO I-III) dargestellt.

Es wird deutlich, dass weder die Konstrukte mit

voller Länge, noch die mit verkürztem Transitpeptid einen Import in Chloroplasten von *A. thaliana in vivo* vermitteln können. Alle zeigen eine GFP-Fluoreszenz im Cytosol.

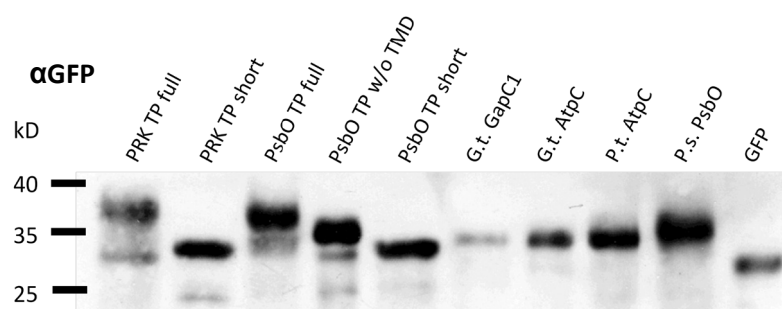
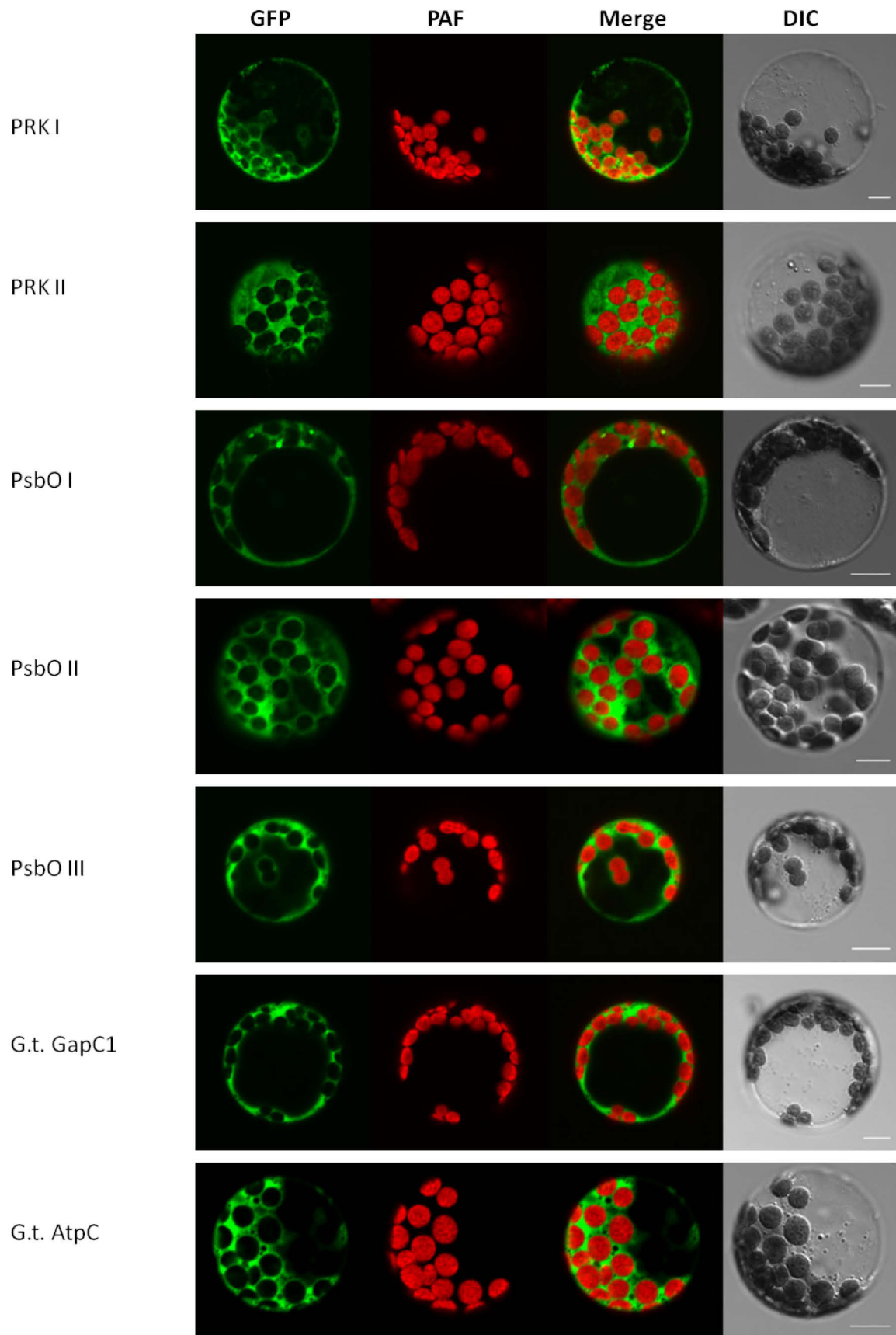


Abbildung 3-6 WesternBlot nach Transfektion der Protoplasten

Mit den Proteinisolaten der transfizierten Protoplasten wurde eine SDS-Page und nachfolgender WesternBlot durchgeführt. Die Detektion der Proteinprodukte der Konstrukte erfolgte über einen α GFP-Antikörper. Alle Konstrukte zeigen die erwarteten Größen.



Maßstab 10µm

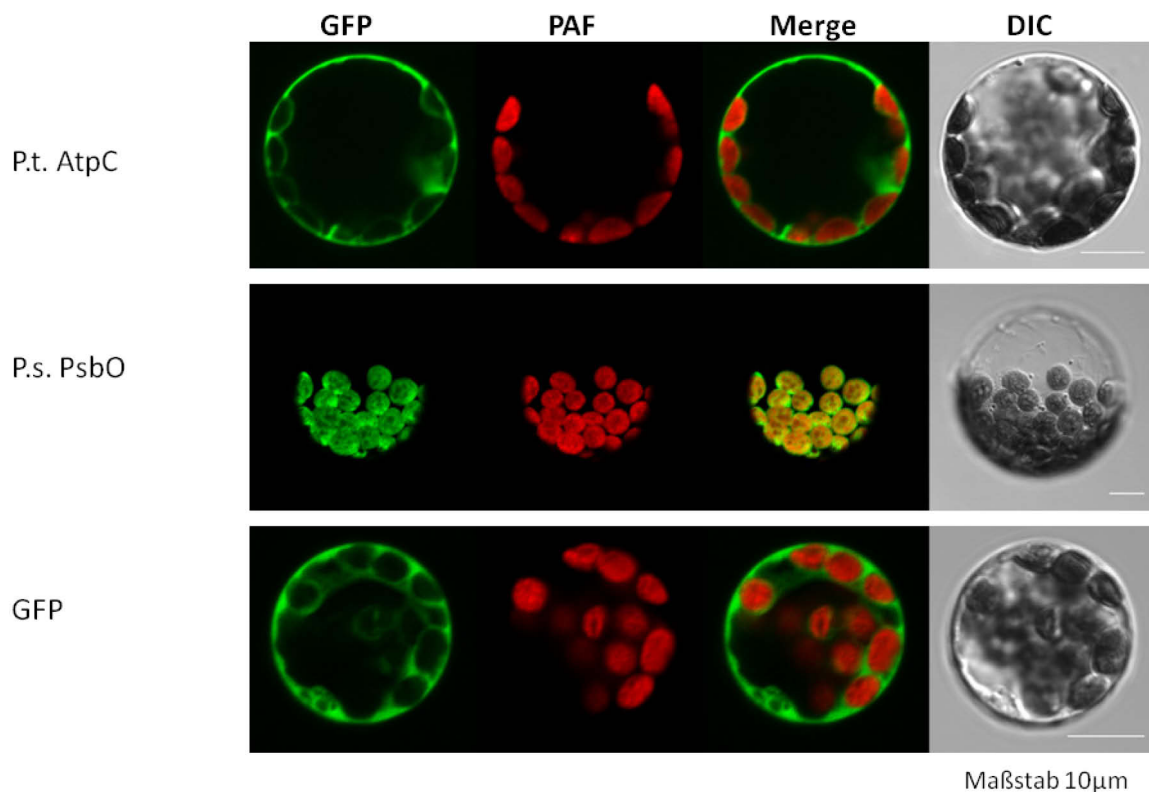


Abbildung 3-7 Analyse der Transitpeptide von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, Cryptophyten und Heterokontophyten in *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten

Mesophyll-Protoplasten wurden aus Blättern von *A. thaliana* isoliert und mit den Konstrukten aus Abbildung 3-5 und weiteren GFP-Fusionen mit Transitpeptiden von *G. theta* und *P. tricornutum* transfiziert. Die GFP-Lokalisationen wurden mit einem Leica SP2 KLSM detektiert. Weder die Transitpeptide voller Länge noch die Transitpeptide mit Deletionen der hydrophoben Domäne und/oder des negativen Bereichs des Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *A. carterae* konnten einen Import in die primäre Plastide von *A. thaliana* vermitteln (cytosolisch Lokalisation). Auch die ausgewählten Transitpeptide (AtpC, GapDH) von Cryptophyten (*G. theta*) und Heterokontophyten (*P. tricornutum*) zeigten keine Importkompetenz (Bozarth *et al.*, 2012). PAF – plastidäre Auto-Fluoreszenz, DIC – Differentieller Interferenz Kontrast

Auch die Konstrukte mit Transitpeptiden aus *P. tricornutum* und *G. theta* (G.t. GapC1/G.t. AtpC/P.t. AtpC) können GFP nicht in die primäre Plastide dirigieren. Auch sie zeigen ausschließlich eine cytosolische GFP-Lokalisation.

Somit zeigen sich die Transitpeptide Nukleus-codierter Proteine der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, der Heterokontophyten und der Cryptophyten in Landpflanzen als nicht funktional. Auch die Verkürzung des Transitpeptids, die eigentlich die Ähnlichkeit zu den Zielsteuerungssequenzen der Landpflanzen erhöht, indem die Ladungsseparation entfällt, führte nicht zum Import in die primäre Plastide.

Um die vollständige Expression der Konstrukte zu verifizieren, wurde Protein aus den transfizierten Protoplasten isoliert und anschließend ein WesternBlot durchgeführt. Es wurde ein Antikörper gegen GFP verwendet. Abbildung 3-6 zeigt, dass für alle Konstrukte ein

Signal bei der zu erwartenden Größe identifiziert werden konnte. Damit ist auszuschließen, dass eventuelle Prozessierungen in der Zelle den Import in die Chloroplasten verhindern.

3.3.2 Die Klasse I BTS in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die Transitpeptide Peridinin-haltiger Dinoflagellaten können in drei Klassen unterteilt werden (Patron *et al.*, 2005). Dabei zeichnen sich die Klassen jeweils durch bestimmte zusätzliche Eigenschaften aus. Wie beschrieben zeigt die Klasse I C-terminal von dem eigentlichen Transitpeptid eine hydrophobe Domäne, für die eine Funktion als STD diskutiert wird. Klasse III zeichnet sich ebenfalls durch eine hydrophobe Domäne aus, die eine TTD darstellt, für die aber ebenfalls eine Funktion als STD diskutiert wird (Nassoury *et al.*, 2003). Der verbleibenden Klasse II fehlt ein solcher hydrophober Bereich vollständig. Hier kann nur das, meist etwas längere Transitpeptid identifiziert werden.

Andrew Bozarth (Bozarth, 2010) fand erste Hinweise auf eine alternative Transportroute über das ER für Nukleus-codierte Proteine mit Klasse I Transitpeptid. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit besonderer Fokus auf eben diese Klasse I in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten gelegt.

3.3.2.1 Neuklassifikation anhand von EST-Daten

Aufgrund der schlechten Datenlage in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten in Bezug auf Genomdaten wurde zunächst eine Untersuchung vorhandener EST-Daten verschiedener Peridinin-haltiger Dinoflagellaten durchgeführt (siehe Anhang 9.5) (Bozarth *et al.*, 2012). Aus diesen Daten wurden potentiell in der Plastide lokalisierte Proteine ermittelt. Sofern mehrere Isoformen eines Proteins für einen Organismus vorlagen, wurde jeweils nur eine Isoform mit einbezogen. Aufbauend auf diesem Datensatz wurden die Proteine mit einem hydrophoben Bereich nach dem Transitpeptid bestimmt und es erfolgte eine Neueinteilung in die Klassen I und III. Alle identifizierten Proteine der Klassen I und III sind in Tabelle 3-5 einzusehen. Sie dienten als Grundlage für eine weitere Charakterisierung.

Name	Klasse	potentielle TPL2	Organis - mus	Lokali- sation	Her- kunft
Glutamat-1-Semialdehyd Aminomutase	I	GRKRHKVAARARVLQRRRAVQVAHKTETSD	Alex. cat.	STR	
PsaC	I	QRRGKLVARR	Alex. cat.	STR	
Phosphoglycolate Phosphatase	I	KRSSRKSSRLSTATSAVMNQATQ	A. c.	STR	
Pbs27/TLP	I	IEVQVPDKIKSDPFELLSVDPTDKKQDRAEFYMKRN	A. c.	THY	
Lhc polyprotein	I	AVFMANTRHVAKPQAKTAMAFFGGAPGMAGFDP5	A. c.	STR	
VIPP1	I	VNHARLTWVSFSTQGPRCFAGHSTGRRNTECVTRHA	A. c.	STR	
Mg-Chelatase Untereinheit	I	QRRRTRARLAEARETSRIVRQSMVAVDERLAAAEAAEQDETNRKWRGL MIPMTR	A. c.	STR	
ChlH, Mg-protoporphyrin IX Chelatase	I	YRKRGGRRTVVAAVATAEATEVAEEK	A. c.	STR	
Delta-Aminolevulinic acid Dehydratase	I	VSRRNRSGRSSRHAVKEAKASVRVPDKTPTDCAIEIRR	A. c.	STR	
PsaD	I	RSPSSVVRRAVPNTPKSSPDTLAGNRTEASVSRPYDKFNDNYPLSSP DQKRTEVTTAEIPRPEDLVDS	A. c.	STR	
Rpl33	I	AIGRLHVSRRSVPSTRAVLCSNQLAPMPSAGISALQARDVAARAHK	A. c.	STR	
Rbcl	I	GLRSRNSRLAKKS	A. c.	STR	
Ferredoxin-NADP(+)Reductase	I	ARVTKKSVTCRATAVKKKGVRVVEGK	C. h.	STR	
Rbcl	I	NHGPPDAT	C. h.	STR	
Transketolase	I	VRSGARKARRSAVATRAT	H. t.	STR	
Lhc Protein	I	KRSRKTGTARRFFGGAGAPAKTITSYKDFADPWLGSA	H. t.	STR	
PEP synthase	I	STSRVVKAKATKAVAVMPRGSVVARQARGGEEDTRVC	H. t.	STR	
Ribose-5-Phosphat Isomerase	I	ARRVARRA	H. t.	STR	
Adenylatkinase	I	TASRRTRQHKVALAARGGADGRL	H. t.	STR	
Lhc protein	I	GVRRRQAKVAQNGARRDLAVAYEESGIELFDNGK	H. t.	STR	
Ferredoxin-NADP(+) Reductase	I	ATKKKGVKVVGKEIPW	H. t.	STR	
GapDH	I	GVVRRRGGRAAAKATAMRATGIA	H. t.	STR	
GapDH	I	RALSTSRRSSVTRRAVSMG	L. c.	STR	
GapDH	I	RALSMGRQSSSVAMRATGIAI	L. p.	STR	
GapDH	I	RRAGKNRTSMEAVGVG	S. m.	STR	
Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase	I	RRSAARPAAVRRRAEADDAYG	L. p.	STR	
Chlorophyll A-C Bindeprotein	I	RRARAAIPLTGRRRLMH	P. I.	STR	
Fructose Bisphosphate Aldolase	I	GKRTPQRAQVARCATAVAKKIGFKN	H. t.	STR/ THY	
Protochlorophyllid Reductase	I	SRRQQRSKRTAKCSVVTR	A. c.	STR/ THY	
PsbF	I	RSAFARQSRVALAAQKA	C. h.	STR/ THY	
TspO und MBR verwandtes Protein	I	AVVNTNPRRGFLAAGAAAVACALLAARSHRAEAAARDAIAMAQA	H. t.	unbek.	
Diadinoxanthin/ Violaxanthin Deepoxidase	I	AKADLRADVPACLLQNCQ	A. c.	THY	
Mg-Protoporphyrin O-methyltransferase	I	LLLGAGGEGDVN	A. c.	THY	
PsaC	I	ASRRGAKAATAMR	A. c.	THY	
PsaC	I	NRKRASITARR	C. h.	THY	
Geranyl Reductase/Hydrogenase	I	VVPRRQRKAAGLAGASMPNKNQRTIRDATIVCAGPRLP	H. t.	THY	
Atpl	I	RRAKAPVSDF	A. c.	THY	
Ferredoxin	I	RRPSKTARQYTTQVILPSLTWLKSGVSAGEL	A. c.	THY/ STR	

Name	Klasse	potentielle TPL2	Organis - mus	Lokali - sation	Her - kunft
Ferredoxin	I	RQGVAAHFKVTLE	Alex. cat.	STR	
Ferredoxin	I	PARPGVAAHFT	H. t.	STR	
Pcp	III	/	Alex. cat.	STR	
Pcp	III	/	Alex. cat.	STR	
Pcp	III	/	Alex. tam.	STR	
Pcp	III	/	A. c.	STR	
Pcp	III	/	H. pyg.	STR	
Pcp	III	/	L. p.	STR	
Pcp	III	/	S. p.	STR	
PsbO	III	/	Alex. cat.	THY	
PsbU	III	/	Alex. cat.	THY	
PsbV	III	/	Alex. cat.	THY	
AtpH	III	/	A. c.	THY	
PetC	III	/	A. c.	THY	
PetC	III	/	A. c.	THY	
PsbO	III	/	A. c.	THY	
PsbU	III	/	A. c.	THY	
PsbV	III	/	A. c.	THY	
AtpH	III	/	C. h.	THY	
PetJ	III	/	C. h.	THY	
PsbO	III	/	C. h.	THY	
AtpH	III	/	H. t.	THY	
Cytochrome c6	III	/	H. t.	THY	
AtpH	III	/	L. p.	THY	
Hypothetisches Protein / Bestropin Familie	III	/	A. c.	THY/ST R	
PetG	III	/	C. h.	THY/ST R	
PsbK	III	/	C. h.	THY/ST R	
AtpH	III	/	Alex. cat.	THY	

Tabelle 3-6 Klassifikation der BTS mit hydrophober Domäne der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Aus den vorhandenen EST-Daten für Peridinin-haltige Dinoflagellaten wurden in der Plastide lokalisierte Proteine mit hydrophober Domäne C-terminal des Transitpeptids (Klassen I und III) identifiziert und weitergehend analysiert. Auf Grundlage der beobachteten Eigenschaften erfolgte eine Neuklassifikation in die Klassen I und III. Klasse I Proteine weisen zwischen hydrophober Domäne und der konservierten Proteinsequenz einen Sequenzbereich mit erhöhtem Vorkommen positiv-geladener und hydroxylierter Aminosäuren auf (Abbildung 3-8). Zusätzlich ist auch gehäuft Alanin zu beobachten. Da dies die beschriebenen Eigenschaften von Transitpeptiden sind, wurde dieser Sequenzbereich als potentielle TPL2 (*transit peptide like*) bezeichnet. Der Klasse III fehlt ein solches Merkmal und der konservierte Bereich beginnt mit oder direkt C-terminal des hydrophoben Bereichs. Die Einschätzung der potentiellen subplastidären-Lokalisation des Proteins erfolgte über die *A. thaliana* Datenbanken PPDB, AT_CHLORO und TAIR. Die Herkunftsbestimmung erfolgte zunächst über das BLAST mit höchstem E-value und ist folgendermaßen farbcodiert: **Chlorophyten** **Rhodophyten** **Prokaryoten** nicht eindeutig. Organismen: A. c. – *Amphidinium carterae*, Alex. cat. – *Alexandrium catanella*, Alex. tam. – *Alexandrium tamarense*, C. h. – *Ceratium horridum*, H. pyg. – *Heterocapsa pygmaea*, H. t. – *Heterocapsa triquera*, L. c. – *Lepidodinium chlorophorum*, L. p. – *Lingulodinium polyedrum*, P. l. – *Pyrocystis lunula*, S. p. – *Symbiodinium pilosum*, S. m. – *Symbiodinium muscatinei*

Zunächst wurden die Signalpeptide mit Hilfe von SignalP ermittelt. Die hydrophoben Bereiche wurden durch TOPCONS und SOSUI bestimmt, dafür wurde die Proteinsequenz

ohne Signalpeptid verwendet. Mit allen Sequenzen wurde ein BLASTp (NCBI und SYM-BLAST) durchgeführt, um zum einen zu bestimmen welches Protein vorliegt und zum anderen den konservierten Bereich zu ermitteln.

Insgesamt wurden 66 sicher Plastiden-lokalisierte Proteine mit hydrophobem Bereich von 12 distinkten Organismen aus den EST-Daten ermittelt. Davon entfallen 40 auf Klasse I und 26 auf Klasse III, dabei nehmen jedoch besonders die PCP (*peridinin-chlorophyll binding protein*) Proteine eine Sonderstellung ein. Da sie nur in Dinoflagellaten auftreten, ist ein Abgleich einer konservierter Region schwierig. Sie zeigen vom Aufbau der BTS jedoch mehr Ähnlichkeit zu den Klasse III Proteinen.

Der Abgleich der zu anderen Organismen konservierten Bereiche zeigte vor allem für die potentiellen Klasse I Proteine eine Region mit 7 – 68 Aminosäuren Länge, anschließend an die hydrophobe Domäne, die nicht Teil der konservierten Region war (diese wird im Weiteren als *transit peptide like 2* - TPL2 bezeichnet). Diese Region zeichnet sich durch einen

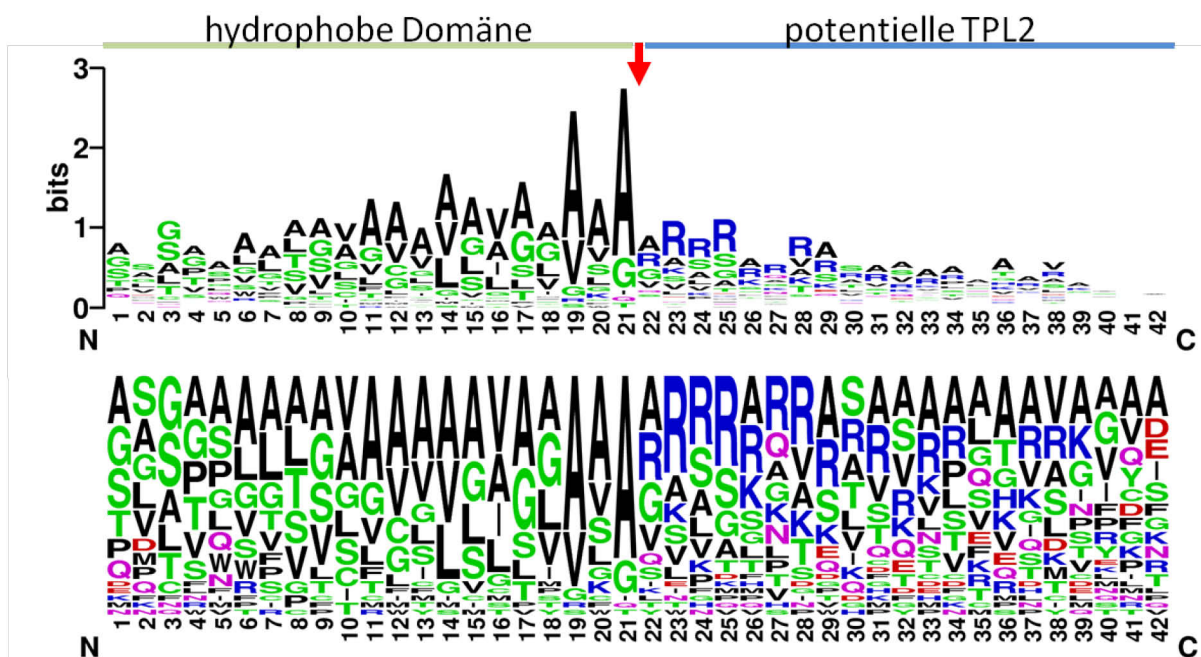


Abbildung 3-8 Sequenzlogos der hydrophoben Domäne und des potentiellen TPL2 der Klasse I Transitpeptide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Basierend auf der Klassifikation der Klasse I Transitpeptide aus den EST-Daten verschiedener Peridinin-haltiger Dinoflagellaten (Tabelle 3-6) wurden Sequenzlogos der hydrophoben Domäne und dem darauf folgenden potentiellen TPL2 erstellt (Crooks *et al.*, 2004). Die Darstellung erfolgt als Sequenzlogo (oben) und als Frequenzlogo (unten). Das Logo verdeutlicht die potentielle Schnittstelle (roter Pfeil) einer Signalpeptidase mit dem typischen AXAI-Motif (von Heijne, 1983) und die Häufung von positiv geladenen (blau, R + K) und hydroxylierten Aminosäuren (grün, S + T) sowie Alanin (schwarz) im potentiellen TPL2 (n=40).

hohen Anteil positiver Ladungen (basische Aminosäuren) aus, die besonders gehäuft direkt auf den hydrophoben Bereich folgen (Abbildung 3-8). Proteine der Klasse III dagegen zeigen C-terminal des hydrophoben Bereichs eher negative Ladungen und diese sind meist schon Teil der konservierten Region.

Da die beschriebenen Bereiche der Klasse I Proteine eine weitere potentielle Zielsteuerungsinformation beinhalten könnten, wurde der hydrophobe Bereich auf potentielle Schnittstellen für z.B. Signalpeptidasen untersucht. Dazu wurde mit den Sequenzen ab dem hydrophoben Bereich mit SignalP eine Schnittstellenvorhersage durchgeführt. Dadurch konnten deutliche Vorhersagen für eine Schnittstelle erhalten werden. Mit der vorhergesagten Schnittstelle als Orientierungspunkt wurden ein Sequenzlogo der Klasse I TPL2 Sequenzen erstellt. Die resultierenden Logos sind in Abbildung 3-8 als Sequenzlogo und Wahrscheinlichkeitsplot dargestellt.

Die Logos zeigen deutlich ein für Signalpeptidasen bekanntes AXA-Motiv (von Heijne, 1983). Alternativ zu Alanin treten in diesem Motiv nur sterisch ‚kleine‘ Aminosäuren wie Valin und Glycin auf. Weiterhin wird die beschriebene positive Ladung, vor allem durch Arginine (R), deutlich (positiv geladene Aminosäuren sind blau dargestellt). Neben den basischen Aminosäuren treten im der potentiellen TPL2 auch vermehrt Serin (S) und Threonin (T) als hydroxylierte Aminosäuren auf. Wie bereits beschrieben, sind auch sie gehäuft in Transitpeptiden vorzufinden (Patron and Waller, 2007).

3.3.2.2 Genomsicher Hintergrund in Proteinen mit Klasse I Transitpeptid

Im Zuge der Identifikation der Proteine über BLAST wurde eine weitere Eigenschaft der Klasse I Proteine deutlich. Ein Großteil dieser Proteine zeigt einen grünen ‚Hintergrund‘. Dies bedeutet, dass viele Klasse I Proteine größere Homologien zu Proteinen der ‚grünen Linie‘ oder Cyanobakterien aufweisen. In Tabelle 3-5 ist dies durch den Farbcode dargestellt. Dabei stehen die grüne Farbe für eine solche Ähnlichkeit zu grünen Proteinen, blau für bakterielle und rot für größere Homologien zu Proteinen aus Organismen der ‚roten Linie‘. Im Falle einer grauen Farbcodierung fehlen deutliche Homologe, wie z.B. im Falle der PCP Proteine, die Dinoflagellaten-spezifisch evolvierten. In Abbildung 3-9 sind für einige Proteine

exemplarisch die phylogenetischen Verhältnisse errechnet worden. Als Grundlage dienten nur die homologen Bereiche, die BTS der Dinoflagellaten wurde somit nicht mit einbezogen. Im Gegensatz zu Klasse I Proteinen (Abbildung 3-9, A+B) weisen Proteine der Klasse III deutlich seltener bzw. kaum eine solche Homologie zu der ‚grünen Linie‘ oder Cyanobakterien auf (Abbildung 3-9, C+D).

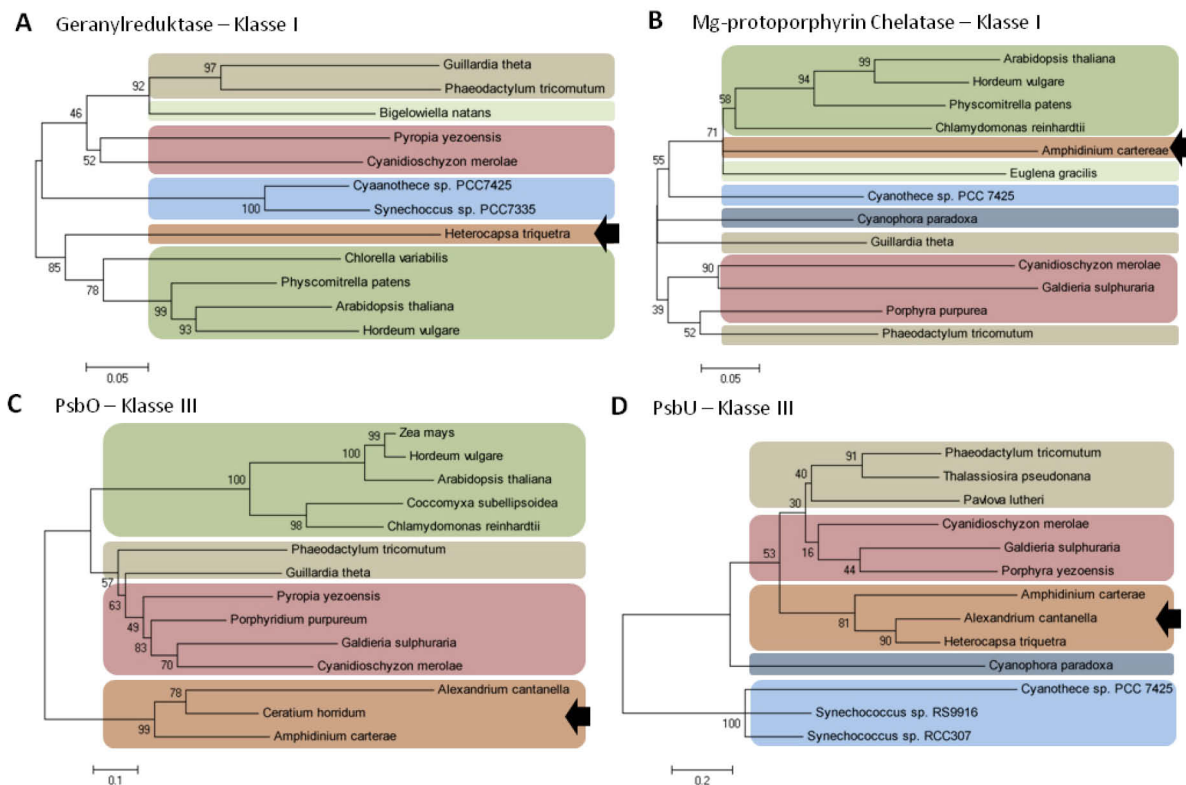


Abbildung 3-9 Untersuchung der phylogenetischen Tendenz einiger Proteine mit Klasse I und III Transitpeptiden

Im Zuge der Neuklassifizierung der Proteine mit Klasse I und III Transitpeptid in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zeigten viele der Klasse I Proteine höhere Homologien zu Proteinen der ‚grünen Linie‘. Die Abbildung zeigt exemplarisch phylogenetische Bäume zu zwei Klasse I Proteinen (A – Geranylreduktase, B – Mg-Protoporphyrin Chelatase). Im Gegensatz dazu wiesen die Klasse III Proteine zumeist eine deutlichere Nähe zur ‚roten Linie‘ auf bzw. eine eher eigenständige Gruppierung (C – PsbO, D – PsbU). Farbcodierung: **Peridinin-haltige Dinoflagellaten**, **Eugleno-/Chlorarachniophyten**, **Crypto-/Hetero-/Haptophyten**, **Chlorophyta**, **Rhodophyta**, **Glaucophyta**, **Cyanobakterien**.

Sie zeigen zumeist größere Homologien zur ‚roten Linie‘ oder eine deutliche Tendenz kann für diese nicht bestimmt werden bzw. sie bilden eine eigene Gruppierung in der phylogenetischen Betrachtung (Abbildung 3-9, C) (Tabelle 3-6, grau).

Die in Abbildung 3-9 dargestellten Phylogenien sollen hier nur als Einschätzung einer phylogenetischen Nähe der gezeigten Proteine dienen.

3.3.3 Untersuchungen zum Proteintransport der Klasse I Proteine im heterologen System

3.3.3.1 Untersuchungen zum Transport der Klasse I Proteine in *A. thaliana*

Die beschriebenen Eigenschaften der Klasse I Proteine lassen auf eine weitere Zielsteuerungsinformation, die auf den hydrophoben Bereich folgt, schließen. Aus diesem Grunde wurden zwei Proteine der Klasse I (PsaD, Rpl33) in *A. thaliana* Protoplasten auf die mögliche Importkompetenz in primäre Plastiden getestet. Dazu wurde, ausgehend von der BTS voller Länge (Signalpeptid bis in das mature Protein), schrittweise Signalpeptid, Transitpeptid und hydrophober Bereich entfernt und jeweils an GFP fusioniert. Somit wurden jeweils vier Konstrukte in den Protoplasten auf ihre Transporteigenschaften getestet. Diese Konstrukte sind schematisch in Abbildung 3-10 dargestellt.

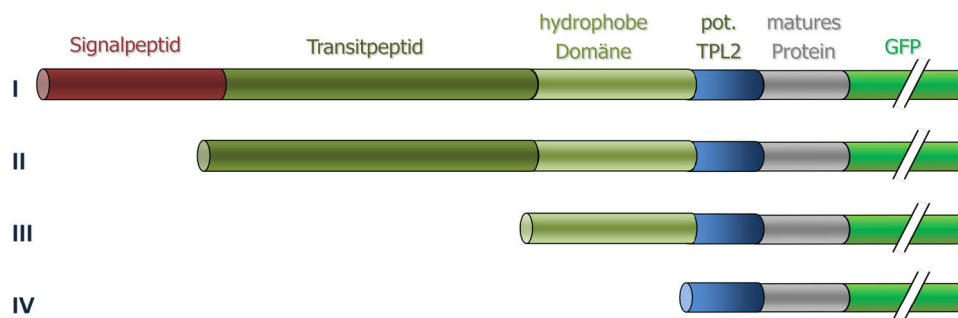
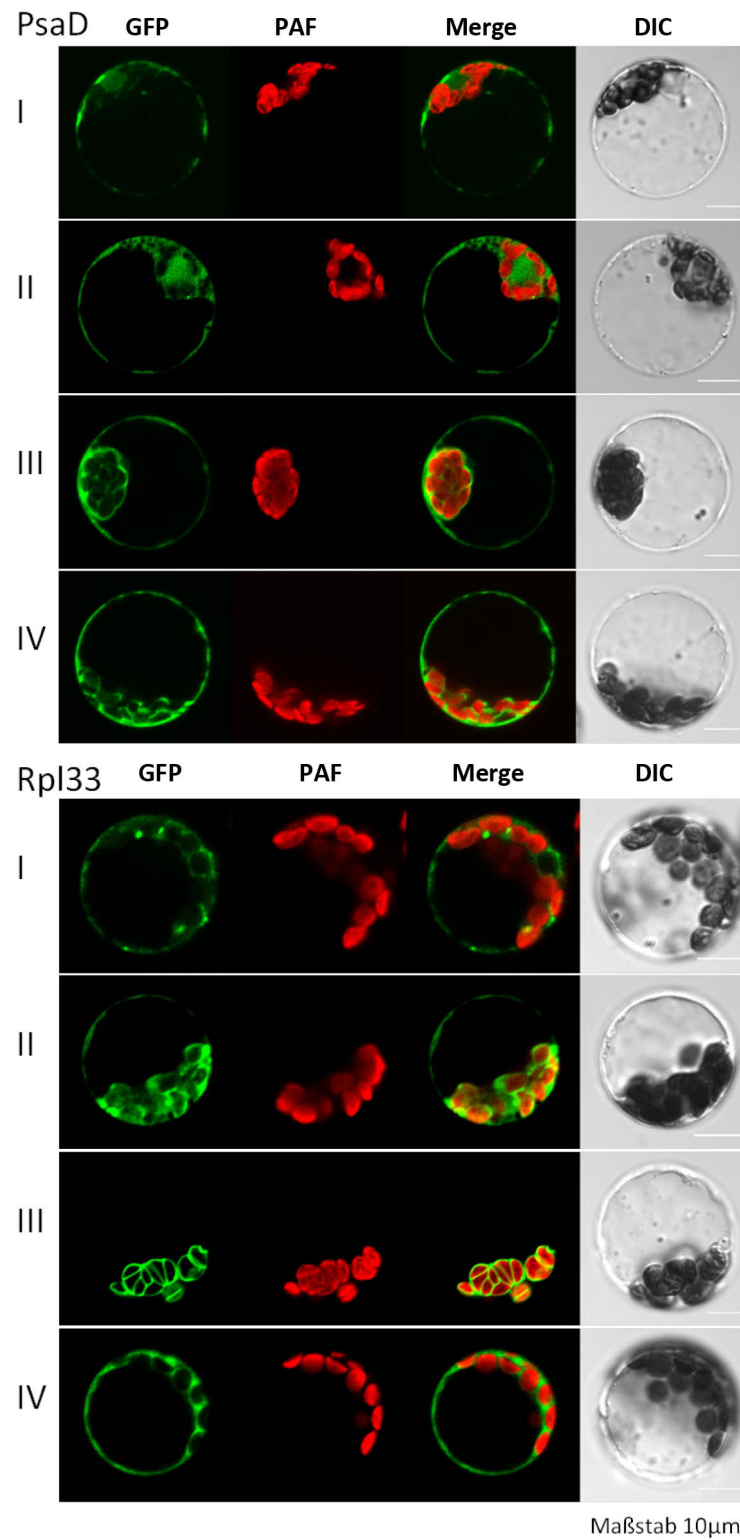


Abbildung 3-10 Schematische Darstellung der Konstrukte zum Test der Klasse I BTS in *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten

Die BTS der Klasse I Proteine PsaD und Rpl33 wurde vollständig und in schrittweisen Deletionen des N-Terminus an GFP fusioniert. Somit standen das Signalpeptid (I), das Transitpeptid (II), die hydrophobe Domäne (III) oder die potentielle TPL2 (IV) N-terminal und wurden in *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten transfiziert und beobachtet ob sie einen Import in die primäre Plastide vermitteln können.

Von besonderem Interesse war hier das Konstrukt vier (IV), da das nun 'freie' potentielle TPL2 einen Transport über TOC und TIC der primären Plastide vermitteln könnte. Die beobachteten Lokalisationen in den *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten sind in Abbildung 3-11 gezeigt.

Die Verteilung für das Konstrukt (I) für PsaD und Rpl33 zeigt eine leicht punktierte bis cytoplasmatische Lokalisation. Diese eher in Punkten konzentrierte Verteilung spricht für einen zumindest teilweisen Import in das ER und damit eine Funktionalität des Signalpeptids auch in *A. thaliana*.



Maßstab 10µm

Abbildung 3-11 Analyse der Klasse I BTS von Psal und Rpl33 in *A. thaliana* Mesophyll Protoplasten

A. thaliana Mesophyll Protoplasten wurden mit schrittweise verkürzten Konstrukten der BTS der Klasse I Proteine Psal und Rpl33 (Abbildung 3-10) transfiziert und die GFP-Lokalisation unter dem Leica SP2 KLSM beobachtet. Die Konstrukte hatten dadurch das Signalpeptid (I), das Transitpeptid (II), die hydrophobe Domäne (III) oder die potentielle TPL2 (IV) N-terminal. Kein Konstrukt konnte den vollständigen Import in die primäre Plastide vermitteln. Die Konstrukte I zeigen eine leicht punktuierete Lokalisation, welches einen zumindest teilweisen Import in das ER darstellt. Mit N-terminalem Transitpeptid (II) ist eine Lokalisation im Cytosol zu beobachten. Die Konstrukte III mit N-terminaler hydrophober Domäne zeigen eine die Plastide direkt umgebende Fluoreszenz, dies jedoch in unterschiedlicher Ausprägung, da für Psal auch noch Fluoreszenz im Cytosol zu beobachten ist. Auch die Konstrukte mit N-terminaler TPL2 wurden nicht in die Plastide importiert und zeigen ausschließlich eine GFP Fluoreszenz im Cytosol. PAF – plastidäre Auto-Fluoreszenz, DIC – Differentieller Interferenz Kontrast

Bis auf das Konstrukt Rpl33-III und in Teilen auch PsdD-III zeigen alle weiteren Konstrukte eine Lokalisation im Cytoplasma. Also konnte weder die TPL1, noch das TPL2 dieser beiden Proteine einen Import in die Plastide vermitteln. Für Rpl33-III, also das Konstrukt mit N-terminaler hydrophober Domäne, wurde eine Lokalisation ausschließlich um die Plastiden beobachtet. Im Falle von PsdD-III ist diese Tendenz auch zu erkennen, allerdings weit weniger ausgeprägt, da auch eine Lokalisation im Cytoplasma zu beobachten ist. Dieses Fluoreszenzmuster ist ähnlich eines *outer envelope protein* (OEP). Hier scheint also ebenfalls kein Import in die Plastide stattgefunden zu haben, jedoch zumindest eine Assoziation mit der Plastidenmembran.

3.3.4 Untersuchungen zum Proteintransport im homologen System

3.3.4.1 Brefeldin A-sensitiver Proteinimport in die Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die Brefeldin A-Sensitivität des Proteintransports in die Plastide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wurde zuerst von Nassoury (Nassoury *et al.*, 2003; Nassoury *et al.*, 2005) beschrieben. Bozarth konnte jedoch feststellen, dass der Transport des Proteins RbcL durch angemessene Konzentrationen von Brefeldin A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$), im Gegensatz zu den Proteinen PRK und PsbO (Klasse II bzw. III), nicht inhibiert wird (Bozarth, 2010). Da es sich bei RbcL um ein Protein der Klasse I handelt, postulierte er für diese Klasse einen Golgi-unabhängigen Transportweg direkt vom ER zur Plastide. Im Rahmen dieser Arbeit wurden andere Vertreter der jeweiligen Klassen auf Grundlage der detaillierteren Klassifizierung (s.o./Abschnitt 3.4.2.1) auf diese Brefeldin A-In- bzw. Sensitivität überprüft. Damit sollte ermittelt werden, ob dies generell für die Proteine der Klasse I Transitpeptide gilt.

Dazu wurden unbehandelte und mit Brefeldin A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) behandelte *A. carterae* Zellen nach Immunogoldmarkierung mit dem Elektronenmikroskop untersucht (Abbildung 3-13). Als Vertreter der verschiedenen Klassen wurden PsdD (Klasse I), AtpC (Klasse II) und PetC (Klasse III) ausgewählt. Die Verteilung der Goldmarkierung wurde dann zwischen behandelten und unbehandelten Zellen verglichen. Die Goldmarkierungen sind in Abbildung 3-12 mit Pfeilen hervorgehoben. Grüne Pfeile verdeutlichen eine Lokalisation in der Plastide, im Gegensatz dazu verweisen rote Pfeile auf eine Lokalisation im Endomembransystem. Die

in Abbildung 3-12 Bilder stellen dabei Beispiele dar, die angegebenen Prozentzahlen beruhen auf der Auswertung einer Serie von mindestens fünf Bildern.

Für PsaD (Abbildung 3-12, A) können mit und ohne Behandlung mit Brefeldin A ca. 80% der Goldmarkierungen in der Plastide beobachtet werden. Im Falle der Klasse II und III Proteine AtpC (Abbildung 3-12, B) und PetC (Abbildung 3-12, C) ist ein deutlicher Effekt durch Brefeldin A zu beobachten. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (ca. 80% der Goldmarkierungen in der Plastide) sind nach der Behandlung mit Brefeldin A ca. 80% der Markierungen im Endomembransystem zu beobachten. Damit scheint Brefeldin A einen Einfluss auf den Transport der Proteine mit Klasse II und III Transitpeptid zu haben, nicht jedoch auf Proteine mit Klasse I Transitpeptid.

Abbildung 3-12 Effekt von Brefeldin A auf den plastidären Proteinimport der Transitpeptidklassen I – III

A. carterae Zellen wurden unbehandelt oder nach Behandlung mit $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (ab 1h vor Licht, insgesamt 5h) geerntet, einer Gefriersubstitution unterzogen und eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden für die Immunogoldmarkierung mit Antikörpern für Proteine, die jeweils die verschiedenen Klassen der Transitpeptide repräsentieren, behandelt: A - PsaD, Klasse I, B – AtpC, Klasse II, C – PetC, Klasse III. Grüne Pfeile zeigen eine plastidäre, rote eine abweichende Lokalisation (Endomembransystem) an. Der Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und mit Brefeldin A behandelten Zellen zeigt, dass für PsaD (Klasse I, A) im Gegensatz zu AtpC (Klasse II, B) und PetC (Klasse III, C) keine Veränderungen in der Lokalisierung der Goldpartikel zu beobachten ist.

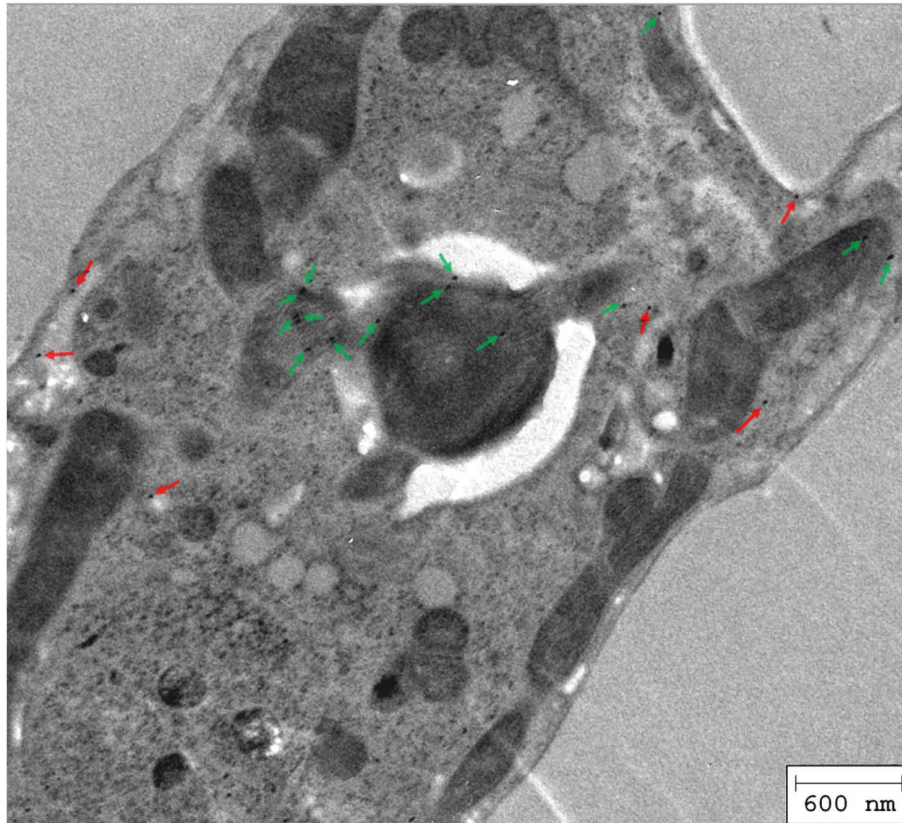
A

αPsaD

Klasse I

1:200

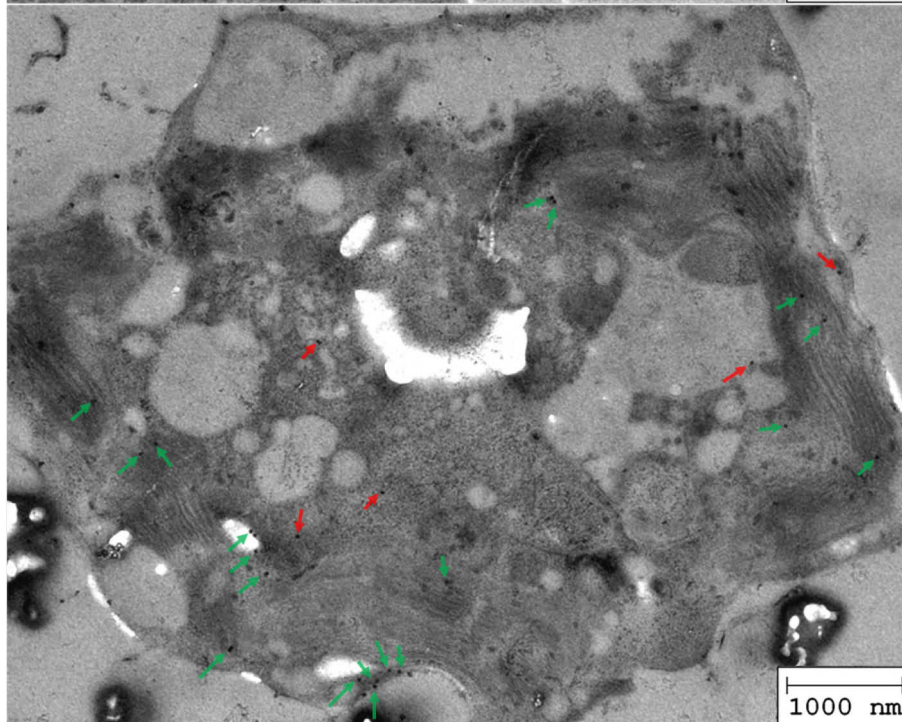
unbehandelt



Brefeldin A

$2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$

5h



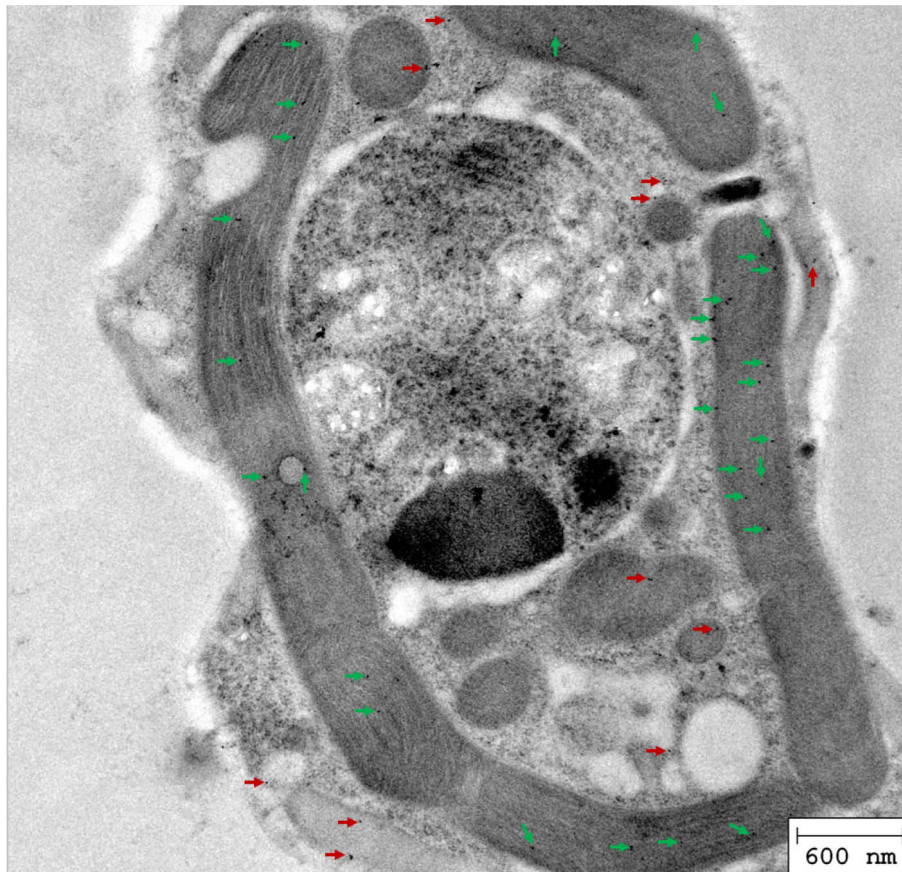
B

α AtpC

Klasse II

1:500

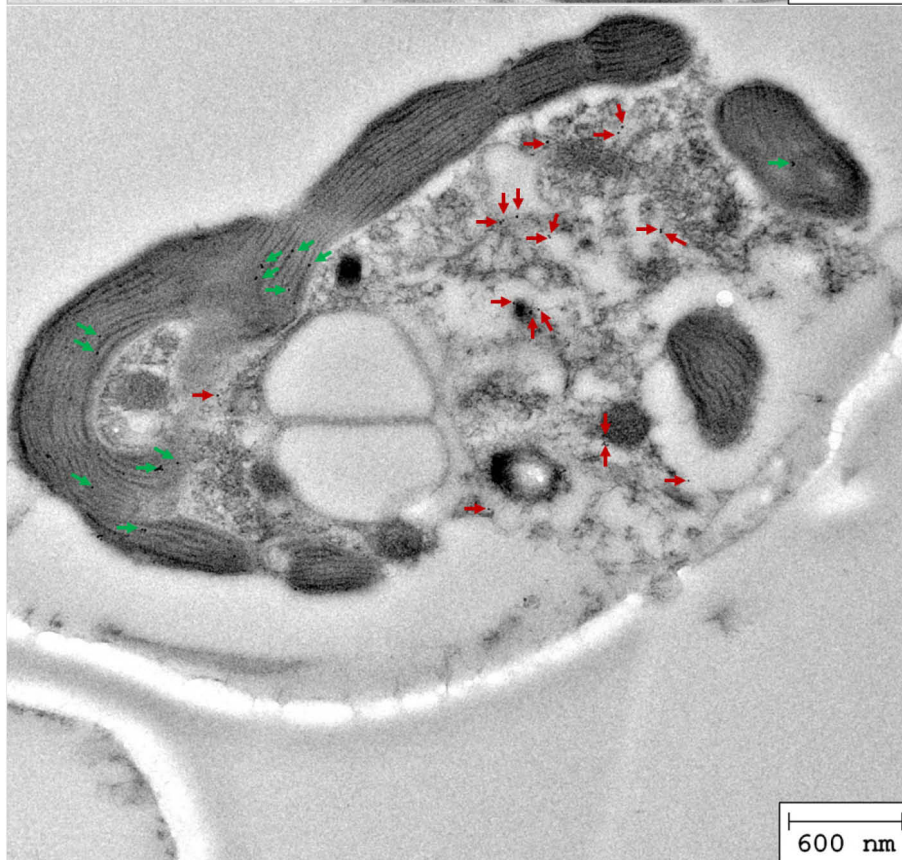
unbehandelt



Brefeldin A

2,5 μ g/ml

5h



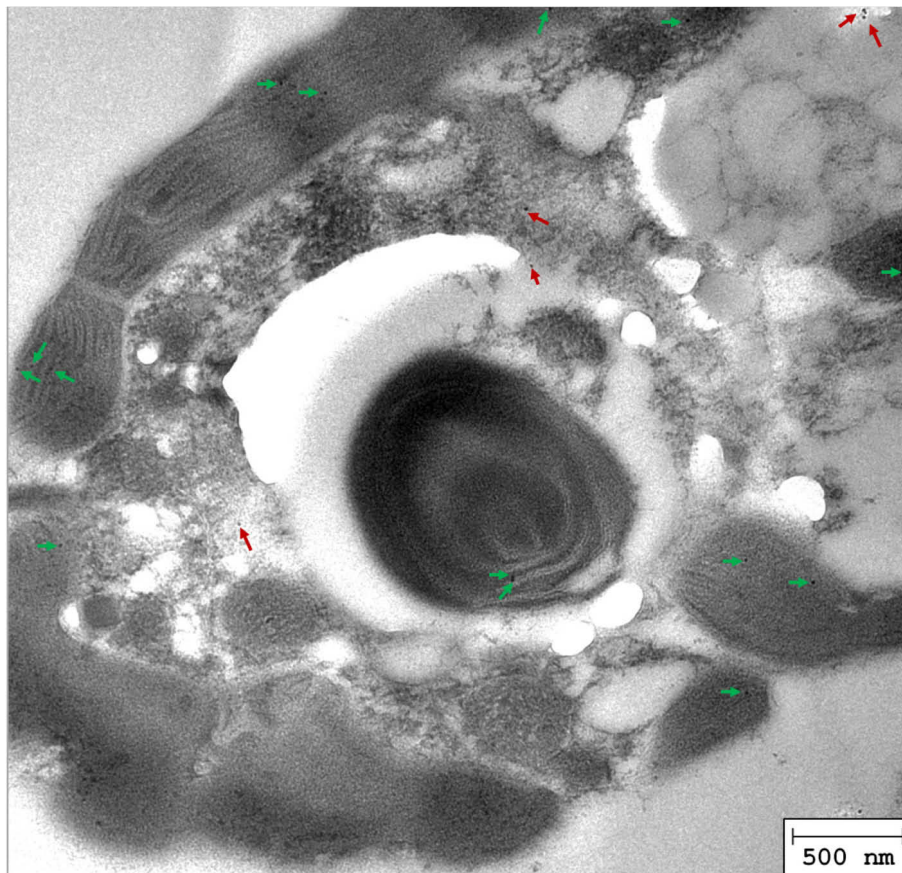
C

α PetC

Klasse III

1:800

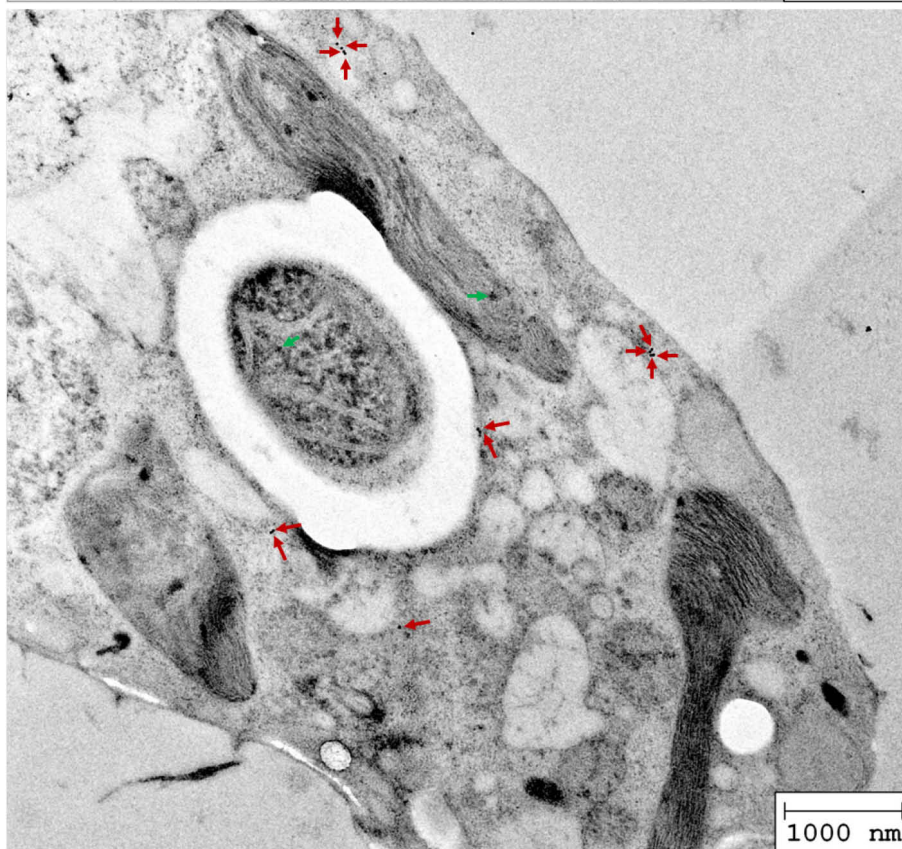
unbehandelt



Brefeldin A

2,5 μ g/ml

5h



4 Diskussion

4.1 Evolution plastidärer RNA-Edierung in Landpflanzen

4.1.1 Das Plastom von *P. endiviifolia*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plastom von *Pellia endiviifolia* erstmalig beschrieben. *P. endiviifolia* ist ein Lebermoos und diese gelten als Schwestergruppe zu allen übrigen Landpflanzen (Qiu *et al.*, 2006) (Abbildung 4-1). Neben *Marchantia polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986), *Aneura mirabilis* (parasitisch und photosynthetisch inaktiv) (Wickett *et al.*, 2008) und *Ptilidium pulcherrimum* (Forrest, 2011) ist dies das vierte sequenzierte Plastidengenom der Lebermoose. Dabei gehört nur *M. polymorpha* zu den Marchantiopsida, *P. pulcherrimum*, *A. mirabilis* und auch *P. endiviifolia* gehören den blättrigen (*leafy*) Lebermoosen, Jungermanniopsida, an (Heinrichs *et al.*, 2007). Dabei sind sie jedoch unterschiedlichen Unterklassen zugeordnet. Die Pelliidae, in die *P. endiviifolia* gruppiert, bilden unter den Jungermanniopsida eine sehr früh divergierende Gruppe (vor ca. 330 Millionen Jahren) (Heinrichs *et al.*, 2007) (Abbildung 4-1). Das Plastidengenom von *A. mirabilis* wird für die weitere Betrachtung nicht mit einbezogen, da es sich bei diesem Lebermoos um einen parasitisch lebenden, nicht photosynthetisch aktiven Organismus handelt. Dadurch unterliegt er eigenen Selektionsdrücken, die sich auch in der Organisation des Plastoms äußern (Wickett *et al.*, 2008).

Wie schon Forrest und Kollegen (Forrest, 2011) postulierten, scheinen die Plastome der Lebermoose im Bezug auf Genomgröße, Anordnung und Codierungskapazität einer gewissen ‚Stasis‘ zu unterliegen. Das hier sequenzierte Plastidengenom von *P. endiviifolia* weist im Vergleich mit denen von *M. polymorpha* und *P. pulcherrimum* keine bedeutenden Inversionen bzw. Umstrukturierungen in der Genomorganisation auf. So zeigt auch die Genomgröße von 120556 bp keine große Varianz im Vergleich zu denen von *M. polymorpha* (121055 bp) und *P. pulcherrimum* (119007 bp) (Tabelle 3-1). Die Daten für *P. endiviifolia* stützen also die vorgeschlagene ‚Stasis‘ bei den Plastomen der Lebermoosen im Hinblick auf die generelle Organisation, Genanordnung und Größe (Grosche *et al.*, 2012).

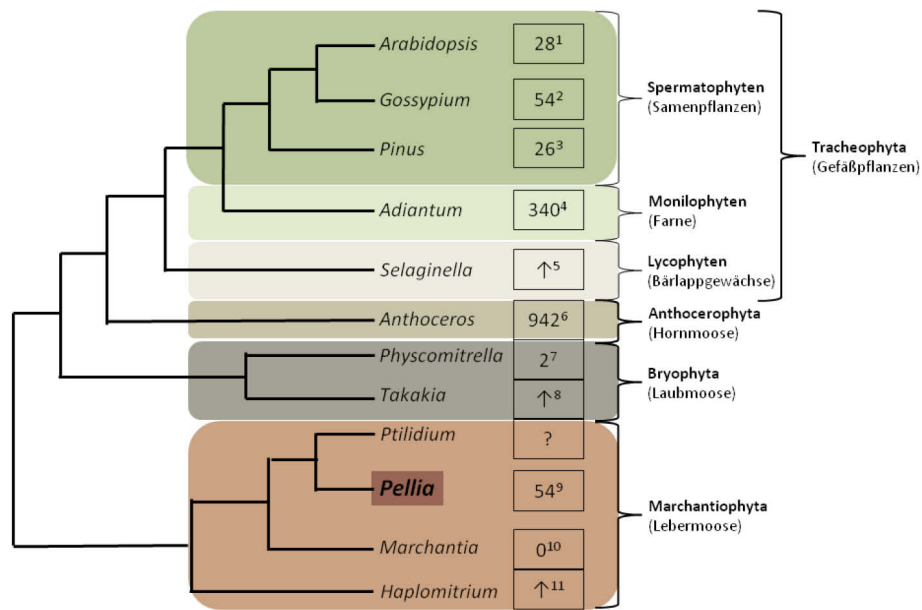


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der Phylogenie der Landpflanzen mit Fokus auf Moose und plastidäre RNA-Edierung

Die Abbildung zeigt schematisch die Phylogenie der Landpflanzen (Heinrichs *et al.*, 2007) und exemplarische plastidäre Editotypen. Besonderer Fokus liegt hier auf den Moosen (Horn-, Laub und Lebermoose). ↑ bezeichnet Editotypen, die noch nicht vollständig bestimmt wurden, für die jedoch eine hohe Anzahl an Edierungsstellen vermutet wird.¹ (Tillich *et al.*, 2005) ² (Jiang *et al.*, 2012) ³ (Wakasugi *et al.*, 1996) ⁴ (Wolf *et al.*, 2004) ⁵ (Smith, 2009) ⁶ (Kugita *et al.*, 2003) ⁷ (Miyata *et al.*, 2002; Miyata & Sugita, 2004; Rüdinger *et al.*, 2009) ⁸ (Sugita *et al.*, 2006) ⁹ (Grosche *et al.*, 2012) ¹⁰ (Groth-Malonek *et al.*, 2007) ¹¹ (Freyer *et al.*, 1997; Steinhäuser *et al.*, 1999)

Die größten Unterschiede zwischen diesen Genomen liegen vor allem in kleineren Insertionen bzw. Deletionen in intergenischen Bereichen, im codierenden Bereich der *ycf* Gene (mit zumeist unbekannten Funktionen) und bei den genauen Übergängen zwischen LSC, IRs und SSC. So ist für *P. pulcherrimum* nur *ycf1* annotiert, das dem *orf1068* in *M. polymorpha* und dem so bezeichneten *ycf1-1* in *P. endiviifolia* entspricht. Hingegen fehlt dort anscheinend der *orf464* (*M. polymorpha*) bzw. *ycf1-2* (*P. endiviifolia*). Ein Abgleich der Sequenz von *ycf1-2* mit dem Plastidengenom von *P. pulcherrimum* macht deutlich, dass homologe Sequenzbereiche in der entsprechenden Region des Plastoms nur noch fragmentiert vorliegen und kein *open reading frame* mehr zu identifizieren ist (Daten nicht gezeigt). Damit scheint nur das in *P. endiviifolia* als *ycf1-1* bezeichnete Gen die essentielle Funktion des *ycf1* (Drescher *et al.*, 2000) auszumachen.

Im Falle von *ycf66* wurde für *P. endiviifolia* die entsprechende Region mit potentiellen Start- und Stopcodons zwar identifiziert, es konnte jedoch kein Transkript amplifiziert werden. Es besteht also keine Evidenz für transkriptionelle Aktivität. Die Funktion von *ycf66* ist bisher unbekannt. Erst kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass es in Farnen mindestens viermal unabhängig zum Verlust dieses Gens gekommen ist. Daher scheint *ycf66*, zumindest in Farnen, nicht essentiell zu sein (Gao *et al.*, 2011). Da der *open reading frame* in *P. endiviifolia*

jedoch vollständig erhalten ist, kann nicht von einem Verlust ausgegangen werden. Damit ist eher von einem äußerst geringen Transkriptlevel oder transkriptioneller Inaktivität unter den verwendeten Kulturbedingungen bzw. dem vorliegenden Lebenszyklus auszugehen.

Generell ist die Konservierung innerhalb der als *ycf* bezeichneten Gene eher gering, gerade im Vergleich mit den übrigen codierenden Bereichen. Dies wird besonders anhand der ca. 550 bp großen Deletion im *ycf2* Gen in *P. endiviifolia* im Vergleich zu *M. polymorpha* deutlich.

Unter den diskutierten Genomen zeigt *M. polymorpha* mit 71,19% den höchsten A/T-Gehalt, gefolgt von *P. pulcherrimum* (66,78%) und *P. endiviifolia* (64,11%). Ein hoher A/T-Gehalt ist unter anderem ein Kennzeichen der Genome von Organellen. Es wird vermutet, dass sich dieser A/T-Gehalt, ausgehend von den aufgenommenen und bereits A/T-reichen Bakterien, im Zuge der Endosymbiose weiter erhöhte (Howe *et al.*, 2003). Dennoch zeigen plastidäre Genome unterschiedliche Ausprägungen des A/T-Gehalts (Tabelle 4-1). Die detaillierten Gründe dieser Tendenz sind weitgehend unbekannt, jedoch gibt es einige Hypothesen wie es zu einer Verschiebung im Verhältnis zwischen G/C und A/T kommt. So wird entweder eine Genkonversion mit Tendenz zu A/T bzw. ein Selektionsdruck zu A/T -Mutationen (Howe *et al.*, 2003; Kusumi and Tachida, 2005; Khakhlova and Bock, 2006) oder eine Selektion zu einer höheren Translationseffizienz und dadurch erhöhten A/T-Gehalts angenommen (Morton, 1998). Erst kürzlich wurde jedoch eine ‚Ausnahme‘ zu dieser A/T-Tendenz identifiziert. So zeigen die Spezies der Lycophyte *Selaginella* einen ungewöhnlich hohen G/C-Gehalt (und dadurch geringen A/T-Gehalt) (Smith, 2009). Dieser äußerst geringe A/T-Gehalt scheint jedoch auf *Selaginella* begrenzt und wird mit einem verringerten Mutationsdruck hin zu A/T begründet, dessen Ursache jedoch unbekannt ist (Smith, 2009). Festzuhalten ist also, dass die Tendenz zu einem erhöhten A/T-Gehalt vorliegt. Dies bedeutet jedoch auch, unabhängig von den treibenden Faktoren, dass eine erhöhter A/T-Gehalt in einem gewissen Sinne eine ‚fortgeschrittene‘ Evolution ausdrückt.

4.1.2 Der plastidäre Editotyp von *P. endiviifolia*

Die Sequenzierung des Plastoms von *P. endiviifolia* erfolgte hier vor allem als Grundlage für die Bestimmung des plastidären Editotyps. Die Lebermoose sind für die Untersuchung plastidärer RNA-Edierung insbesondere interessant, seitdem das Fehlen der RNA-Edierung in

Organellen von *M. polymorpha* gezeigt wurde (Freyer *et al.*, 1997; Steinhauser *et al.*, 1999) (Abbildung 4-1). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass in der gesamten Untergruppe der Marchantiopsida, im Gegensatz zu den Jungermannidiopsida, keine RNA-Edierung auftritt (Rüdinger *et al.*, 2008). Damit besteht die Frage, ob es sich dabei um einen sekundären Verlust handelt oder ob sich eine RNA-Edierungsmaschinerie in dieser Gruppe der Lebermoose nie entwickelt hat. Weiterhin gelten die Lebermoose als ancestrale Landpflanzen und bilden eine Schwestergruppe zu allen übrigen Embryophyta (Qiu *et al.*, 2006) (Abbildung 4-1). Dies macht sie zu einer interessanten Gruppe um einen Einblick in die Entstehung und Verbreitung der plastidären RNA-Edierung zu gewinnen.

Bisher basierten die Untersuchungen der RNA-Edierung in Lebermoosen jedoch primär auf Studien, die sich auf bestimmte Gene des Plastoms bzw. Chondroms beschränkten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vollständiger Editotyp bestimmt um eine grundlegende Einordnung dieses Editotyps im Hinblick auf die Entstehung und Evolution der RNA-Edierung zu ermöglichen. Es wurden alle Transkripte Protein-codierender Gene, mit Ausnahme von *ycf66* (s.o.), auf RNA-Edierung hin untersucht. Dadurch konnten 54 Edierungsstellen identifiziert werden, die ausschließlich dem C→U Typ angehören. Die Edierungen betreffen vor allem Gene, die für Proteine der Elektronentransportkette codieren und führen gehäuft zu Aminosäureaustauschen von Serin oder Prolin zu Leucin oder von Serin zu Phenylalanin (Abbildung 3-2). Damit zeigt die plastidäre RNA-Edierung in *P. endiviifolia* die typischen zuvor für Landpflanzen beschriebenen Charakteristika der RNA-Edierung in Plastiden (Tillich *et al.*, 2006). Dies war Voraussetzung für das weitere Vorgehen, denn nur bei einer vorliegenden Vergleichbarkeit dieser Systeme kann auch von gleicher Funktion bzw. gleichem Funktionsumfang ausgegangen werden. Im Hinblick auf die Betrachtung der Evolution ist dies ebenfalls von Bedeutung, da somit auch erwartet werden kann, dass das System einem vergleichbaren Selektionsdruck ausgesetzt war.

Im Vergleich mit den bisher bekannten Editotypen liegt auch die Gesamtzahl der plastidären Edierungen in *P. endiviifolia* auf einem ähnlichen Niveau wie in Samenpflanzen (25-54) (Tillich *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2012) (Abbildung 4-1). Im Gegensatz dazu stehen die zahlreichen plastidären Edierungen in Hornmoosen und Farnen (Kugita *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004). Innerhalb der Moose zeigt sich daher ein eher uneinheitliches Bild. Hier existieren allein in den Lebermoosen mit den Marchantiopsida, wie bereits beschrieben, Organismen ohne jegliche RNA-Edierung in den Organellen neben den Haplomitriopsida, als älteste Linie

der Lebermoose (Groth-Malonek *et al.*, 2007) (Abbildung 4-1), für deren Vertreter *Haplomitrium mnioides*, anhand von Untersuchungen des mitochondriellen *nad7* Gens, eine äußerst hohe Anzahl an RNA-Edierungsstellen angenommen wird (Groth-Malonek *et al.*, 2007). Auch in Laubmoosen variiert das Ausmaß der bekannten RNA-Edierung. So wurden für das Moos *Physcomitrella patens* nur zwei plastidäre Edierungen beschrieben (Miyata *et al.*, 2002; Miyata and Sugita, 2004; Rüdinger *et al.*, 2009), wohingegen für *Takakia lepidozioides* allein für sechs untersuchte Gene 132 RNA-Edierungsstellen beschrieben wurden (Sugita *et al.*, 2006).

4.1.3 Der plastidäre Editotyp im evolutionären Kontext

Es stellt sich also die Frage, wie sich die deutlichen Unterschiede zwischen den heute zu beobachtenden Editotypen entwickelt haben. Zur Beantwortung dieser Frage muss auch geklärt werden, wie es überhaupt zu einem Edieren der RNA kommen kann bzw. wie ein Bedarf für eine Edierungsmaschinerie entsteht. Wie beschrieben, resultieren die Edierungen meist in einem Austausch der codierten Aminosäure. Dieser Austausch hat insofern eine große Bedeutung als das dies häufig Aminosäuren mit deutlich voneinander abweichenden biochemischen Eigenschaften betrifft. Damit ist davon auszugehen, dass der Austausch der Aminosäuren direkten Einfluss auf die Funktionalität der codierten Proteine hat. Schon früh nach der Entdeckung der plastidären RNA-Edierung wurde postuliert, dass durch die Edierung konservierte Aminosäuren wiederhergestellt werden (Maier *et al.*, 1996). In der Tat wurde erst kürzlich in *Gossypium hirsutum* (Baumwolle) gezeigt, dass plastidäre RNA-Edierung zum einen konservierte Aminosäuren wiederherstellt und damit zum anderen auch direkten Einfluss auf die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des codierten Proteins hat (Jiang *et al.*, 2012). Somit ist die RNA-Edierung für die Aufrechterhaltung der Funktionen der Plastide unbedingt notwendig.

Damit ist jedoch nicht geklärt wie sich die unterschiedlichen Editotypen zwischen den, auch teilweise nah verwandten, Arten und Gruppen der Landpflanzen entwickelt haben. Bisher ist RNA-Edierung in Organellen nur bei Landpflanzen bekannt. So konnte bisher in Algen keine Edierungen gezeigt werden. Die beschriebenen Edierungen in Dinoflagellaten zeigen eine höhere Vielfalt an Typus und Funktion (Zauner *et al.*, 2004; Wang and Morse, 2006; Lin *et al.*, 2007), damit sind sie mit der Edierung in Landpflanzen nur bedingt vergleichbar. Diese RNA-

Edierung ist vermutlich das Ergebnis der beschriebenen und besonderen Genomevolution der Dinoflagellaten und damit eher aus konvergenter Evolution hervorgegangen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass plastidäre RNA-Edierung zuerst in den gemeinsamen Vorgängern der Landpflanzen aufgetreten ist (Tillich *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2008). Die Hypothesen, warum gerade mit dem Landgang der Pflanzen eine RNA-Edierung notwendig wurde, sind vielfältig. So wird zum einen ein Sequenzdrift hin zu GC-reichen Sequenzen postuliert (Fujii and Small, 2011). Als Grund dafür wird vor allem eine zeitweise erhöhte T→C Transitionsrate angeführt, deren Ursprung jedoch unbekannt ist. Nach der Hypothese von Tillich und Maier (Tillich *et al.*, 2006) kam es durch die veränderten Lebensbedingungen, die mit einem Landgang aufkamen (wie z.B. einer erhöhten UV-Strahlung (Maier *et al.*, 2008)), zu zahlreichen Mutationen in den Genomen. Als Antwort darauf könnte sich dann eine Edierungsmaschinerie entwickelt haben.

Für die Edierung in Plastiden und Mitochondrien scheinen die PPR-Proteine von besonderer Bedeutung, da sie als die wichtigsten *trans*-Faktoren für die Edierungsmaschinerie gelten (Rüdinger *et al.*, 2012). In den Genomen der Algen finden sich nur wenige Gene, die für diese Proteine codieren. So konnten in der Grünalge *C. reinhardtii* lediglich 12 PPR-Gene identifiziert werden (Merchant *et al.*, 2007), wohingegen z.B. in *A. thaliana* und *O. sativa* 450 bzw. 477 dieser Gene gefunden werden konnten (Lurin *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2008). Eine Untersuchung verschiedener Genome auf codierte PPR-Gene zeigte, dass es mit der Entwicklung der Landpflanzen zu einer Expansion der PPR-Gene, vermutlich über Retrotransposition, gekommen ist (Lurin *et al.*, 2004; Rivals *et al.*, 2006; O'Toole *et al.*, 2008; Fujii and Small, 2011). Von besonderer Bedeutung ist dabei jedoch, dass die Anzahl der codierten PPR-Gene der PLS-Klasse mit der Gesamtanzahl der RNA-Edierungen in beiden Organellen korreliert (Fujii and Small, 2011; Rüdinger *et al.*, 2012). Damit scheint sich also eine Edierungsmaschinerie auf Basis der PPR-Proteine entwickelt zu haben um den entstandenen, schädlichen Mutationen entgegen zu wirken.

Diese schädlichen Mutationen können jedoch auch durch Rückmutation hin zum ursprünglichen Zustand eliminiert werden. Durch diese Rückmutationen im Laufe der weiteren Evolution kommt es zu den unterschiedlichen, heute zu beobachtenden Editotypen (Tillich *et al.*, 2006). Allerdings können RNA-Edierungsstellen auch heute noch durch Mutationen, die einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben, entstehen (Drescher *et al.*, 2002; Tillich *et al.*, 2005). Damit jedoch die Gesamtzahl der RNA-Edierungen abnimmt, muss

von einer höheren Rate für Rückmutationen als für Mutationen, die eine RNA-Edierung notwendig machen, also einem 'Neuerwerb' von Edierungsstellen darstellen, ausgegangen werden. Für den Verlust von Edierungsstellen, wie wir sie heute beobachten können, ist somit eine Tendenz zu zunehmenden A/T-Gehalt von Vorteil. Handelt es sich bei *M. polymorpha* wirklich um einen sekundären Verlust, ist davon auszugehen, dass alle zuvor edierten Stellen re-mutiert sind und somit eine RNA-Edierung obsolet machten. Allerdings können wir in allen anderen Pflanzengruppen heute noch RNA-Edierung beobachten. Dort kam es also nicht zu einem vollständigen Verlust der Edierung. Dies wirft die Frage auf, warum es nicht auch dort zu 'genügend' Rückmutationen gekommen ist. Tillich zeigte dazu (Tillich *et al.*, 2006) eine generelle Betrachtung der bekannten Editotypen der Spermatophyta. Dabei wurde deutlich, dass plastidäre RNA-Edierungsstellen vor allem in einem Sequenzumfeld (T_A) erhalten geblieben sind, für das eine geringere C→T Mutationsrate angenommen wird. Die Beobachtungen zu Mutationswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Sequenzumfelds gehen auf Morton zurück. Dieser untersuchte den Einfluss

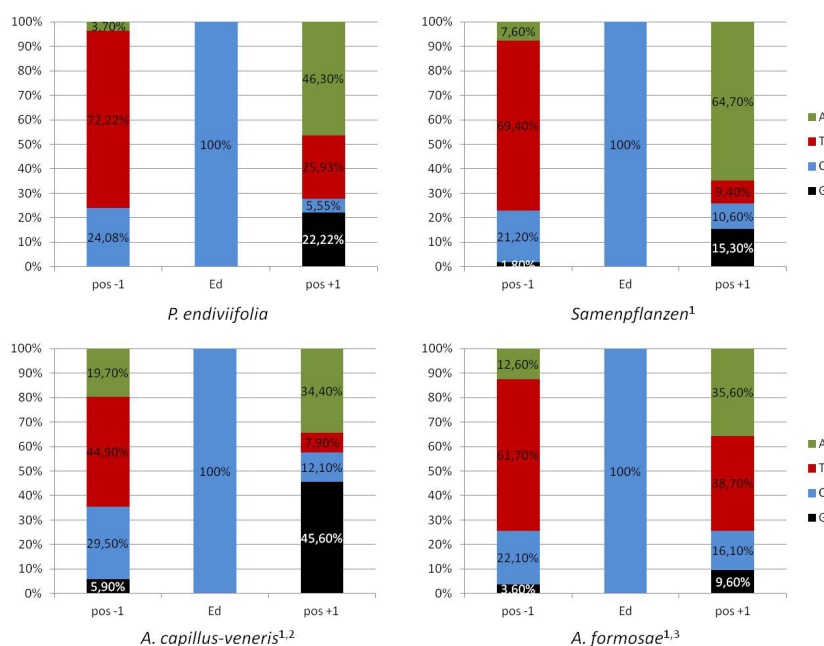


Abbildung 4-2 Übersicht des Sequenzkontexts verschiedener plastidäre Editotypen

Die Abbildung zeigt den Sequenzkontext der plastidären Edierungsstellen von *P. endiviifolia* im Vergleich zu den Edierungen der Samenpflanzen, des Farns *A. capillus-veneris* und des Hornmooses *A. formosae* (nach ¹ (Tillich *et al.*, 2006) ² (Wolf *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006) ³ (Kugita *et al.*, 2003))

auf Mutationen durch das Sequenzumfeld für die Plastiden der Samenpflanzen (Morton *et al.*, 1997; Morton, 2003). So ist die Wahrscheinlichkeit für eine C→T Mutation in einem Umfeld mit 5' liegendem Nukleotid mit Pyrimidinbase, und hier vor allem Thymidin, und 3' folgendem Nukleotid mit Purinbase, und hier wiederum vor allem

Adenin, bedeutend geringer. Dies hat direkten Einfluss auf die RNA-Edierung in Plastiden (Tillich *et al.*, 2006). Aufgrund dieser geringeren Mutationswahrscheinlichkeit sehen wir, wie bereits angedeutet, RNA-Edierungsstellen heute verstärkt in einem T_A, T_N oder N_A

Sequenzumfeld. Tillichs Beobachtungen sind unter Einbeziehung der Daten für *P. endiviifolia* in Abbildung 4-2 dargestellt. Die untersuchten 85 Edierungsstellen der Samenpflanzen zeigen in 69,4% der Fälle einen T_N und zu 64,7% ein N_A Kontext. Einen vollständigen T_A Kontext zeigen 47% (40) der von Tillich untersuchten Edierungsstellen (Tillich *et al.*, 2006). Die Analyse des Sequenzkontexts der 54 Edierungen aus *P. endiviifolia* weist eine vergleichbare Verteilung auf. So befinden sich 72,22% aller Edierungen in einem T_N und 46,3% in einem N_A Kontext. Insgesamt 17 Edierungsstellen (ca. 32%) weisen einen vollständigen T_A Kontext auf. Somit zeigen auch die Edierungen in *P. endiviifolia* eine deutliche Tendenz zu einem Sequenzumfeld mit verringerter C→T Mutationsrate, indem der Verlust der Edierungsstelle zumindest erschwert wird. Im Vergleich dazu ist diese Tendenz bei Hornmoosen und Farnen, die eine weitaus höhere Anzahl an plastidären Edierungsstellen aufweisen, kaum bzw. nur deutlich abgeschwächt zu erkennen (Abbildung 4-2).

In diesem Zusammenhang wird auch deutlich, warum es gerade zu einem Aminosäureaustausch von S→L, S→F und P→L kommt. Diese wurden gehäuft für Landpflanzen (Tillich *et al.*, 2006) aber auch im Rahmen dieser Arbeit für *P. endiviifolia* identifiziert. So wird die Aminosäure Serin durch das Codon tCn (das große C kennzeichnet die Edierungsstelle) codiert und diese weist, wie beschrieben, einen Sequenzkontext verringerter Rückmutation auf. In *P. endiviifolia* ist allein dieses Codon in 29 Fällen (54,71%) von Edierung betroffen. Prolin wird durch cCn codiert, allerdings resultieren acht (15,1%) von insgesamt 13 Prolin-Austauschen aus einer Edierung des Codons cCa, also ebenfalls einem wie oben beschriebenem Sequenzkontext (Morton, 2003; Grosche *et al.*, 2012). Abgesehen von den *silent* Edierungen führen die RNA-Edierungen in *P. endiviifolia*, wie bereits beschrieben, zu einem Austausch von Aminosäuren mit deutlich divergierenden biochemischen Eigenschaften oder stellen in zwei Fällen ein Startcodon wieder her. Es ist durchaus vorstellbar, dass es auch zu anderen Mutationen kam, die ebenfalls das auf der DNA codierte Codon hin zu einer anderen Aminosäure änderten. Sofern diese Veränderung jedoch keinen Einfluss auf die Proteinaktivität hatte, bestand auch keine Notwendigkeit, dem entgegenwirkende Edierungsfaktoren zu evolvieren.

Die phylogenetische Nähe von *P. endiviifolia* zu *M. polymorpha* (Abbildung 4-1) ermöglicht weiterhin einen direkten Abgleich der Sequenzen der jeweiligen Gene. Dabei zeigt sich, dass zwar nicht jeder T/C-Unterschied zwischen den Protein-codierenden Bereichen dieser beiden Plastome eine Edierungsstelle darstellt, aber jede Edierungsstelle in *P. endiviifolia* in

M. polymorpha genomisch mit einem Thymidin codiert ist (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass in *M. polymorpha* diese Stellen re-mutiert sind und damit auch der Bedarf der RNA-Edierung weggefallen ist (Grosche *et al.*, 2012). Erweitert man bei diesem Vergleich den Blick auch auf den jeweiligen Sequenzkontext, so ist auch dieser in den meisten, jedoch nicht allen Fällen identisch (Daten nicht gezeigt). Es kann selbstverständlich nur der heutigen *status quo* des Sequenzumfelds betrachtet werden und somit nicht die einzelnen Mutationsvorgänge. Da jedoch der sekundäre Verlust der RNA-Edierung in *M. polymorpha* durch unter anderem auch diese Studie immer wahrscheinlicher erscheint (Groth-Malonek *et al.*, 2007; Rüdinger *et al.*, 2008; Grosche *et al.*, 2012), würde dies bedeuten, dass in *M. polymorpha* dieser ‚Flaschenhals‘ der verringerten Rückmutationswahrscheinlichkeit überwunden wurde. Eine Möglichkeit, warum dies in den Marchantiopsida jedoch nicht in den Jungermannidiopsida erfolgte, ist ein Zeitraum beschleunigter Evolution bzw. erhöhter Mutationsrate. Für Moose wurde zunächst, von Fossilienfunden abgeleitet, von einer geringen morphologischen Evolutionsrate, auch auf eine geringe molekulare Evolutionsrate geschlossen (Lacey, 1969; Crum, 1972). Andere Studien wiederum lassen jedoch auf mit den Samenpflanzen vergleichbare molekulare Evolutionsraten schließen (Cummins and Wyatt, 1981; Wyatt *et al.*, 2005). Betrachtungen des mitochondriellen Genoms der Lebermoose hingegen gehen von einer sehr konservativen Evolution aus (Ohyama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Wie bereits beschrieben, stützen die Genomdaten für *P. endiviifolia* die bereits von Forrest (Forrest, 2011) vorgeschlagene ‚Stasis‘ in Lebermoosen in Bezug auf den generellen Aufbau des Plastidengenoms (Grosche *et al.*, 2012). Dies kann jedoch nur für die Struktur (z.B. Genanordnung etc.) des Plastoms gelten. Betrachtet man den A/T-Gehalt der

Organismus	A/T-Gehalt Plastom	Anzahl plastidärer Edierungsstellen
<i>P. endiviifolia</i> ¹	64,1%	54
<i>G. hirsutum</i> ²	62,7%	54
<i>A. thaliana</i> ³	63,7%	28
<i>P. patens</i> ⁴	71,5%	2
<i>M. polymorpha</i> ⁵	71,2%	0

Tabelle 4-1 Zusammenhang zwischen plastidärer RNA-Edierung und A/T-Gehalt des Plastoms

Die Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen dem A/T-Gehalt des Plastoms und der Anzahl der identifizierbaren plastidären RNA-Edierungsstellen an den Daten ausgewählter Landpflanzen. Mit zunehmenden A/T-Gehalt können liegt eine geringere Anzahl an RNA-Edierungen vor. ¹(Grosche *et al.*, 2012) ²(Lee *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2012) ³(Sato *et al.*, 1999; Tillich *et al.*, 2005) ⁴(Miyata *et al.*, 2002; Miyata and Sugita, 2004) ⁵(Ohyama *et al.*, 1986; Freyer *et al.*, 1997)

Genome, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Dies ist in Tabelle 4-1 dargestellt. So liegt der A/T-Gehalt des Plastoms von *P. endiviifolia* im Bereich derer von *A. thaliana* und *G. hirsutum*. Im Vergleich dazu zeigen die Plastidengenome von *M.*

polymorpha und *P. patens*, die keine bzw. äußerst wenige RNA-Edierungsstellen aufweisen, einen wesentlich höheren A/T-Gehalt. Dies zeigt zum einen die bereits beschriebene Korrelation zwischen Anzahl der RNA-Edierung und dem G/C- bzw. A/T-Gehalt eines Plastidengenoms (Smith, 2009) und zum anderen, dass es zumindest für einige Organismengruppen Zeitspannen mit einer dynamischen Evolutionsrate gegeben haben muss, die einen solchen Unterschied, auch zwischen relativ nah verwandten Arten, verursacht haben könnten (Grosche *et al.*, 2012). Dieser Zusammenhang konnte auch innerhalb der Samenpflanzen nachgewiesen werden. So wurde z.B. für die Klasse der Geraniaceae sowohl für das mitochondrielle als auch das plastidäre Genom eine erhöhte Rate an Nukleotidsubstitutionen beobachtet (Parkinson *et al.*, 2005; Guisinger *et al.*, 2008), während im Falle des Chondriums eine vergleichsweise geringe RNA-Edierungsrate gezeigt werden konnte (Parkinson *et al.*, 2005). Eine solche Zeitspanne einer dynamischen Sequenzevolution ist auch für den gemeinsamen Vorläufer der Lebermoose, jedoch nach der Divergenz der Haplomitriopsida (Groth-Malonek *et al.*, 2007) (Abbildung 4-1), bzw. im Weiteren den Vorläufer der heutigen Marchantiopsida vorstellbar. Damit kann es zu der heute beobachtbaren relativ geringen Edierungsfrequenz in *P. endiviifolia* bzw. dem Wegfall der RNA-Edierung in *M. polymorpha* gekommen sein.

In *P. endiviifolia* konnten, wie beschrieben, ausschließlich plastidäre Edierungen des C→U Typs identifiziert werden, damit fehlt der reverse Typus (U→C) vollständig. Edierungen von Uracil zu Cytosin sind vor allem in Organismen mit zahlreichen Edierungsstellen, wie z.B. bei Farnen, und Hornmoosen (Kugita *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004) oder in geringem Maße auch in Mitochondrien der Spermatophyta identifiziert worden (Gualberto *et al.*, 1990; Schuster *et al.*, 1990). Auch zu der Herkunft bzw. Entwicklung dieses Edierungstyps gibt es verschiedene Szenarien. Zum einen ist es möglich, dass dieser Typus besonders schnell verloren gegangen ist (Maier *et al.*, 2008; Chateigner-Boutin and Small, 2011) oder sich, zum anderen, erst später entwickelt hat und damit nur bei gewissen Gruppen der Landpflanzen vorliegt (Knoop, 2011). Sollte jedoch tatsächlich ein Zeitraum in der Entstehung der Landpflanzen existiert haben, in dem ein Sequenzdrift hin zu GC-reichen Sequenzen bestand (Fujii and Small, 2011), ist dies eine mögliche Quelle für Mutationen von T→C. Diese Mutationen könnten dann die Mutationen, die eine Edierungen des reversen Typs (U→C) nötig machten, re-mutiert und damit diesen Edierungstyp weitgehend eliminiert haben. Wie bereits beschrieben ist dieser Edierungstyp, betrachtet man die gesamten Landpflanzen,

selten und, im Falle der plastidären RNA-Edierung, nur bei einer hohen Anzahl an Edierungsstellen zu beobachten. Damit scheint ein beschleunigter Verlust der U→C Edierung, unabhängig von den Bedingungen die eine solche Edierungsform hervorriefen, wahrscheinlich.

Im Bezug auf die plastidäre RNA-Edierung in *P. endiviifolia* und ihre Entstehung und Evolution in Landpflanzen lässt sich also zusammenfassen:

Transkripte Protein-codierender Gene werden an 54 Stellen von C→U ediert. Der plastidäre Editotyp von *P. endiviifolia* ist damit sowohl in Anzahl der Edierungen als auch in Sequenzkontext vergleichbar mit den Editotypen der Samenpflanzen. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Edierungen stützt dies einen sekundären Verlust der RNA-Edierung in dem Lebermoos *M. polymorpha*. Weiterhin sind die Edierungsstellen in *P. endiviifolia* auf einen Sequenzkontext mit geringerer Mutationsrate konzentriert. Dadurch erfüllen sie die Kriterien für das Modell der Entstehung der RNA-Edierung nach Tillich (Tillich *et al.*, 2006). Im Zuge des Landgangs der Pflanzen kam es zu zahlreichen Mutationen im plastidären Genom. Um dem entgegen zu wirken, entwickelte sich ein RNA-Edierungssystem, dass auf RNA Ebene die Mutationen der DNA kuriert. Durch Rückmutationen, teilweise begünstigt durch Zeiten dynamischer Sequenzevolution, können diese Edierungsstellen wegfallen. Dies führte zu den heute beobachtbaren Editotypen bzw. zum Verlust der Edierung in *M. polymorpha* und noch beobachtbare Edierungen sind, bei bereits vorangeschrittener Reduzierung, primär in einem Sequenzumfeld geringer Rückmutationsrate erhalten geblieben.

4.2 Genomstruktur der komplexen Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Dinoflagellaten sind bedeutende Mitglieder des Phytoplanktons, dennoch ist bisher nur vergleichsweise wenig über die molekulare Zellbiologie dieser Organismen bekannt. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigen die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten jedoch zahlreiche besondere Eigenschaften im Hinblick auf genomische und zelluläre Organisation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sogenannte *minicircles*, das vermeintlich verbliebene Plastidengenom, isoliert und untersucht.

4.2.1 *Minicircles* des Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *A. carterae*

4.2.1.1 *Minicircles* und ihre Varianz

Als *minicircles* werden kleine zirkuläre DNA-Moleküle bezeichnet, die in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten für ca. 17 Gene cyanobakteriellen Ursprungs codieren (Dang and Green, 2010). Diese Zahl bezieht sich auf die Gesamtheit der bisher identifizierten *minicircles* aller untersuchten Organismen. Diese *minicircles* sind 2-10 kB groß und codieren jeweils für ein bis fünf Gene. Allerdings sind bisher auch zahlreiche 'leere' *minicircles* beschrieben worden, das heißt, dass auf ihnen kein *orf* identifiziert werden konnte (Hiller, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden *minicircles* des Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* mittels einer Transposonmutagenese isoliert. Dazu wurden diese zunächst aus der Zelle wie ein Plasmid isoliert und anschließend mit Hilfe eines Transposons, das eine Kanamycin-Resistenzkassette und einen bakteriellen *ori* (*origin of replication*) enthält, mutagenisiert. Dieses Transposon ermöglichte dann die Selektion und Klonierung über *E. coli*. Somit konnten die *minicircles*, vergleichbar mit Plasmiden behandelt und näher charakterisiert werden.

Auf diesem Wege konnten 17 *minicircles* aus *A. carterae* isoliert und charakterisiert werden. Diese weisen eine Größe zwischen 1868 - 2704 bp auf und codieren für die 23S rRNA (4), *petD* (2), *psbA*, *psbB* oder *psbD/psbE/psbI* (je 1). Auf insgesamt acht *minicircles* konnte kein *orf* identifiziert werden. Damit entsprechen die hier isolierten *minicircles* in Codierungskapazität und Größe den bisher bekannten *minicircles* aus *A. carterae* (Barbrook

et al., 2001; Hiller, 2001; Barbrook *et al.*, 2006), dies wird auch dadurch deutlich, dass sie in ihrer Sequenz Ähnlichkeit zu bisher bekannten *minicircles* zeigen (Anhang 9-4). Somit erweitern sie zwar nicht das Spektrum der auf *minicircles* der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten codierten Gene, zeigen aber deutlich ihre Varianz. So sind sie weder zu den annotierten *minicircles* (Barbrook *et al.*, 2001; Hiller, 2001; Barbrook *et al.*, 2006) noch untereinander vollkommen identisch (Tabelle 3-5), auch wenn sie das gleiche Gen bzw. die gleichen Gene codieren. Dies zeigt, dass die Gesamtheit der *minicircles* als relativ heterogener Pool vorliegen muss. Die codierenden Bereiche sind zumeist konserviert, jedoch zeigen gerade die codierenden Bereiche der 23S rRNA kleinere Deletionen bzw. Insertionen. Es ist unklar, ob alle isolierten *minicircles* auch wirklich transkribiert werden und ob die unterschiedlichen Isoformen funktional sind. Eine transkriptionelle Aktivität kann von der *minicircle*-Sequenz selbst nicht abgeleitet werden, da sie keine üblichen Promotersequenzen besitzen. Bisher gibt es nur Vermutungen über mögliche nicht-kanonische Promoterregionen (Zhang *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2008). Erst kürzlich wurde jedoch auch für *A. carterae* die Transkription polycistronischer und mehrere Kopien enthaltene Transkripte mittels *rolling circle* und nachfolgender poly-Uridylylation bestätigt (Barbrook *et al.*, 2012). Damit wird also der vollständige *minicircle* transkribiert, ob dies jedoch für die gesamte Population gilt und welche Faktoren dies steuern ist nach wie vor unbekannt.

Ein weiterer bedeutender Unterschied zu annotierten *minicircles* konnte in der abweichenden *core*-Region identifiziert werden. Der *core* der *minicircles* dient vermutlich als *origin of replication*, aber auch eine Funktion als Promoter wird diskutiert (Koumandou and Howe, 2007; Leung and Wong, 2009; Dang and Green, 2010). Sequenzfragmente der für *A. carterae* beschriebenen Region (Hiller, 2001; Barbrook *et al.*, 2006) konnten zwar identifiziert werden, dies aber nur in verkürzten Formen und nicht auf allen isolierten *minicircles* einheitlich. Im Gegensatz dazu konnte eine allen hier identifizierten *minicircles* gemeinsame Region eingrenzt werden (Abbildung 3-4). Um zu überprüfen ob es sich bei dem vorliegenden Isolat auch tatsächlich um *A. carterae* handelt, wurde auch die 18S rRNA sequenziert. Diese zeigte eine Übereinstimmung von 98% mit der in Datenbanken hinterlegten Sequenz für *A. carterae* (Daten nicht gezeigt). Damit ist davon auszugehen, dass es sich auch hier um einen *A. carterae* Stamm handelt. Also zeigen die *minicircles* auch innerartlich eine bedeutende Varianz und dies sogar in Sequenzbereichen für die eine Funktion als Replikationsursprung angenommen wird. Wie zuvor vermutet (Barbrook *et al.*,

2006), ist der *core* damit tatsächlich nicht nur speziesspezifisch sondern vielmehr stammspezifisch. Dabei ist der hier so benannte *core-min* (min – Minimum), der Bereich vollständiger Konservierung, im Vergleich mit dem von Barbrook identifizierten *core* mit 60 bp relativ kurz. Darüber hinaus kann auch ein 180 bp langer, hier benannter *core-ext* (ext – extended) identifiziert werden, der jedoch über die gesamte Länge keine vollständige Übereinstimmung zeigt. Dieser *core-ext* erstreckt sich jeweils ca. 60 bp 5' und 3' vom *core-min* und zeichnet sich durch nur vereinzelt konservierte Sequenzbereiche aus. Es ist unklar, ob die *minicircles* dadurch in funktionelle Untergruppen unterteilt werden oder diese nicht konservierten Bereiche für die, bisher nicht vollständig geklärte (Leung and Wong, 2009; Barbrook *et al.*, 2012), Funktion des *core*-Bereichs nicht von Bedeutung sind.

4.2.1.2 Mögliche Funktion der *minicircles*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Transposonmutagenese erstmalig zur Isolation von *minicircles* aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten verwendet. Die Transposonmutagenese ermöglicht einen Einblick in die vollständige Population der *minicircles* eines Organismus und deren Varianz, dies gilt vor allem für Spezies in denen noch keine *core*-Region bzw. überhaupt keine *minicircles* bekannt sind.

Die *minicircles* der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten gelten, soweit bisher bekannt, als das am stärksten reduzierte Plastidengenom. Die sonst auf Plastomen codierten Gene scheinen in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten primär im Nukleus zu codieren oder verloren gegangen zu sein (Hackett *et al.*, 2004). Die beschriebene Varianz der *minicircles* zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies und auch innerhalb der *minicircles*-Population einer einzigen Kultur macht sie umso mehr zu einem ungewöhnlichen Plastidengenom. Gerade diese innerartlichen Unterschiede in nicht codierenden Regionen lassen darauf schließen, dass *minicircles* besonders schnell evolvierende DNA Fragmente darstellen.

Zum einen stellt sich die Frage, warum gerade die 17 bisher beschriebenen Gene noch auf den *minicircles* codiert sind. Von den noch auf *minicircles* codierten Genen sind 15 auch auf jedem anderen bisher bekannten Plastom photosynthetisch aktiver Organismen codiert (Hackett *et al.*, 2004). Eine Hypothese für den Verbleib gerade dieser Gene in der Plastide besagt, dass Gene aufgrund der Hydrophobizität ihrer Genprodukte, die einen Transport über Membran verhindern würde, noch in der Plastide codieren (Daley and Whelan, 2005).

Dagegen sprechen im Fall der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten jedoch der beschriebene Aufbau der Zielsteuerungssequenzen vieler Nukleus-codierter Proteine mit ihren hydrophoben Sequenzbereichen und, dass die auf *minicircles* codierten Proteine sowohl membrangebundene als auch lösliche Proteine sind. Im Zuge einer ‚Kolokalisation für Redox-Regulation‘ Hypothese wird dagegen angenommen, dass vor allem die Gene die für Kernkomponenten des Photosyntheseapparates codieren (PSI und II, Cytochrom b_6-f Komplex und ATP Synthase) noch in der Plastide verbleiben um schnell auf Veränderungen der Redox-Bedingungen reagieren zu können (Allen, 2003; Allen *et al.*, 2005). Damit stellen die noch auf dem Plastidengenom der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten codierten Gene eventuell den minimalsten Satz an Genen dar, die in der Plastide für eine ausreichende Redox-Regulation verbleiben müssen. Jedoch gibt es auch Faktoren, die diese Hypothese unschlüssig erscheinen lassen. Zum einen ist sie auf einen Organismus mit einer Vielzahl von Plastiden ausgelegt. In einem Organismus liegt die Grundproblematik der Redox-Regulation nicht in der Geschwindigkeit der Signalantwort und des Transportes, sondern, im Falle eines Organismus mit mehreren Plastiden, eher darin, die entsprechende Plastide gezielt mit den nötigen Proteinen zu versorgen. In Zellen wie *A. carterae* und vielen anderen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, die nur eine große, die annähernd halbe Zellen einnehmende Plastide tragen, kommt diese Argumentation nicht zum Tragen. Weiterhin sind die Komplexe des Photosyntheseapparates Mosaike aus plastidär-codierten und nukleus-codierten Proteinen. Es ist fragwürdig ob die Proteine, die noch auf *minicircles* codieren, für eine entsprechende Redox-Antwort ausreichen. Zum anderen wurde für den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *Ceratium horridum* gezeigt, dass dort die *minicircles* im Nukleus lokalisieren und in der Plastide eine ‚*high-molecular weight*‘ DNA verblieben ist, die das Plastidengenom darstellen könnte (Laatsch *et al.*, 2004). Dies konnte jedoch nicht für andere Peridinin-haltige Dinoflagellaten gezeigt werden (Howe *et al.*, 2008). Für *L. polyedrum* wurde das *psbA* Gen auf einem unkonventionell großen, im Vergleich mit *minicircles*, DNA-Molekül nachgewiesen (Wang and Morse, 2006). Diese Beobachtungen führten auch zu der Spekulation, dass es sich bei den beschriebenen, größeren DNA-Molekülen um Übergangsformen der *minicircles* handeln könnte (Howe *et al.*, 2008). Ein weiterer interessanter Punkt liegt in der zunehmenden Kopienzahl der *minicircles* in Abhängigkeit der Wachstumsphase einer Kultur. Mit zunehmendem Alter der jeweiligen Kultur und der Verlangsamung des Wachstums

nimmt die Kopienzahl der einzelnen *minicircle* auf bis zu jeweils 100 Kopien zu (Koumandou and Howe, 2007).

Letztendlich ist die Herkunft bzw. Entstehung der *minicircles* noch immer unbekannt und Teil intensiver Diskussion (Zhang *et al.*, 1999b; Howe *et al.*, 2003; Hackett *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2008; Lin, 2011). Allerdings machen die hohe Kopienzahl, die Variabilität bzw. vermutlich beschleunigte Sequenzevolution und ihre widersprüchliche Organisation und Lokalisation sie zu einem Kandidaten als potentiell DNA-*shuttle* für endosymbiontischen Gentransfer (Howe *et al.*, 2003). Die heute ‚verbliebenen‘ *minicircles* tragen dann in diesem Sinne eventuell die noch zu transferierenden Gene oder jene, die, vielleicht aus Gründen der Regulation, nicht transferiert werden können. Jedoch können erst weitere Untersuchungen bzw. vollständige Genomdaten klären ob die *minicircles* wirklich ausschließlich das verbliebene Plastidengenom der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten darstellen oder noch weitere Funktionen übernehmen bzw. Zwischenstufen darstellen.

4.3 Untersuchungen zum plastidären Proteinimport der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind vermutlich aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hervorgegangen (Janoušek *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den anderen Organismen mit einem solchen evolutionären Hintergrund (siehe 1.1.2) ist ihre komplexe Plastide lediglich von drei Membranen umgeben. Dies scheint direkten Einfluss auf den plastidären Proteinimport und die dafür nötigen Zielsteuerungssequenzen zu haben. So haben sich in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten N-terminale Extensionen mit unterschiedlichen Charakteristika entwickelt, die den Transport in die Plastide vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die eigentlichen Transitpeptide als auch, im Besonderen, die sogenannte Klasse I der Zielsteuerungssequenzen auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

4.3.1 Generelle Aspekte der Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die BTS der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind, wie oben beschrieben (Abbildung 1-6), aufgrund unterschiedlicher Charakteristika in drei Klassen unterteilt worden (Patron *et al.*, 2005). Allen gemein ist jedoch das kanonische Signalpeptid (SP) für einen ko-translationalen Transport über die ER-Membran und eine Transitpeptid-ähnliche Sequenz (TPL) ähnlich den Transitpeptiden der primären Plastiden. Eben diese TPL (im Weiteren auch Transitpeptid - TP) und deren Charakteristika waren Gegenstand dieser Arbeit. Die Untersuchungen basierten auf der Beobachtung durch Bozarth (Bozarth *et al.*, 2012), dass die TPL der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eine deutliche Ladungsseparation innerhalb der Sequenz aufweist. So sind positive Ladungen in Transitpeptiden, die einen Import in primäre Plastiden vermitteln, meist relativ regelmäßig über die gesamte Sequenz des Transitpeptids verteilt. Weiterhin ist vor allem die positive Nettoladung für den Transport über die TOC/TIC-Maschinerie von entscheidender Bedeutung (Patron and Waller, 2007). Im Falle der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind positive (basische) Aminosäuren jedoch primär auf den N-terminalen Teil des Transitpeptids konzentriert, wohingegen sich negative (saure) Aminosäuren eher im C-terminalen Teil befinden. Dies bewirkt die oben erwähnte Aufteilung

in einen positiv und einen negativ geladenen Teil der TPL (Bozarth *et al.*, 2012). Bozarth erweiterte seine Untersuchungen auch auf die Transitpeptide der Landpflanzen und der Diatomeen. Dies zeigte, dass auch die Transitpeptide der Diatomeen eine, allerdings weniger deutliche, Ladungsseparation aufweisen. Den Transitpeptiden der Landpflanzen hingegen fehlt eine solche Aufteilung vollständig.

Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Importkompetenz der eigentlichen Transitpeptide und die Bedeutung der beschriebenen Ladungsseparation an primären Plastiden von Landpflanzen untersucht. Dazu wurden Mesophyll-Protoplasten aus den Blättern von *A. thaliana* isoliert und mit verschiedenen Konstrukten der BTS zweier plastidärer Proteine aus *A. carterae* (PRK, PsbO) transfiziert. Dafür wurden auch verkürzte Konstrukte der Transitpeptide von Dinoflagellaten erstellt, denen der negative Teil fehlt bzw. im Falle von PsbO auch die potentielle TTD (Abbildung 3-5). Dadurch sollte ein möglicher Einfluss der negativ geladenen Region des Transitpeptids überprüft werden bzw. ob dieser einen Import in primäre Plastiden verhindert. Zusätzlich wurden auch die Transitpeptide der Cryptophyten (*G. theta*; GapC1 und AtpC) und Heterokontophyten (*P. tricornutum*, AtpC) auf eine solche Importkompetenz in diesem System überprüft.

Die Transfektion der Protoplasten und die nachfolgende Analyse der GFP-Lokalisation unter dem KLSM zeigte (Abbildung 3-7), dass weder die nativen Transitpeptide von Dinoflagellaten, Heterokontophyten oder Cryptophyten noch die verkürzten Transitpeptide der Dinoflagellaten eine Importkompetenz in die primären Plastiden der Landpflanzen zeigen. Dies wird durch die Lokalisation von GFP im Cytoplasma des Protoplasten deutlich. Ausschließlich das Transitpeptid von PsbO aus *P. sativum* konnte, wie erwartet, GFP in die Plastide dirigieren und zeigt damit auch die grundlegende Funktionalität des Systems. Weiterhin wird durch den abgebildeten WesternBlot (Abbildung 3-6) deutlich, dass alle Konstrukte in zu erwartender Größe vollständig als Protein vorliegen und somit nicht eine mögliche Abspaltung des GFPs zur cytosolischen Lokalisation führte. Allerdings kann für das PsbO Transitpeptid aus *P. sativum* trotz plastidärer Lokalisation keine Prozessierung des Transitpeptids beobachtet werden. Vermutlich kommt es nicht zu einer Prozessierung des Transitpeptids, da die Länge des verwendeten Transitpeptids genau mit der Vorhersage der Schnittstelle aus ChloroP übereinstimmt. Zwar ist die für eine Prozessierung zuständige *stromal processing peptidase* (SPP) hinsichtlich einer Konsensussequenz nicht sehr eingeschränkt (Rudhe *et al.*, 2004; Teixeira and Glaser, 2012), doch wird die eigentliche

Schnittstelle bzw. Erkennungssequenz durch diese Verkürzung möglicherweise entfernt und damit eine Prozessierung verhindert.

Grundsätzlich ist also festzuhalten, dass die hier verwendeten Transitpeptide nukleus-codierter Proteine der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, aber auch die der Heterokontophyten und Cryptophyten, einen Import von GFP in die primäre Plastide der Landpflanzen *in vivo* nicht vermitteln können (Bozarth *et al.*, 2012). Dies steht im Widerspruch zu bisher beschriebenen Daten bezüglich eines *in vitro* Imports in isolierte Chloroplasten (Lang *et al.*, 1998; Wastl and Maier, 2000; Chaal and Green, 2005). Es zeigt sich also ein deutlicher Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Daten. Die Aussage von *in vitro* Importstudien muss daher eher auf eine generelle Tendenz für eine Importkompetenz in die Plastide angesehen werden. Dagegen können erst *in vivo* Daten die vollständige Stringenz des plastidären Importsystems darstellen, da in einem solchen System auch alle cytosolischen Faktoren involviert sind (Schleiff *et al.*, 2002). Für die Cryptophyte *G. theta* wurden bereits 2005 *in vivo* Importstudien durchgeführt und eine Importkompetenz für nukleomorph-codierte Proteine gezeigt (Hjorth *et al.*, 2005). Hier zeigt sich also ein funktioneller Unterscheid für Transitpeptiden von Proteinen, die im Nukleus oder im Nukleomorph codieren. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Evolutionsgeschwindigkeiten zwischen Nukleus und Nukleomorph zurückzuführen und dem damit zusammenhängenden A/T-Gehalt, der auch die Aminosäurezusammensetzung der Transitpeptide beeinflusst (Douglas *et al.*, 2001). Zumindest scheinen, wie hier gezeigt, die Transitpeptide nukleus-codierter im Gegensatz zu nukleomorph-codierter Proteine im System der Landpflanzen nicht funktional (Douglas *et al.*, 2001; Bozarth *et al.*, 2012). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Transitpeptide, die einen Transport über mehr als zwei Membranen vermitteln, weitere transportrelevante Eigenschaften besitzen, die den Import in primäre Plastiden aufgrund der abweichenden Struktur stören.

Der vergleichbare Aufbau der Transitpeptide der Dinoflagellaten und Chromisten im Gegensatz zu den Transitpeptiden der Landpflanzen kann jedoch einen gemeinsamen evolutionären Ursprung bzw. eine zeitweise gemeinsame Entwicklung verdeutlichen (Bozarth *et al.*, 2012). Obwohl für Dinoflagellaten und Cryptophyten bisher kein Omp85-Protein, welches einen Transport über die zweite (Dinoflagellaten) bzw. dritte (Cryptophyten) Plastidenmembran vermitteln könnte, identifiziert wurde (Bolte *et al.*, 2009), macht der vergleichbare Aufbau der Transitpeptide zwischen Heterokontophyten,

Cryptophyten und Dinoflagellaten die Existenz eines solchen wahrscheinlicher (Bozarth *et al.*, 2012). In den folgenden Abschnitten wird dies noch eingehender diskutiert.

4.3.2 Die Klasse I Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Wie beschrieben, können die Nukleus-codierten Plastidenproteine aufgrund unterschiedlicher Charakteristika in drei Klassen unterteilt werden (Abbildung 1-6). In dieser Arbeit waren Proteine mit Klasse I Transitpeptid von besonderem Interesse. Diese zeichnen sich durch eine hydrophobe Domäne aus, die direkt auf das Transitpeptid folgt (Patron *et al.*, 2005) und für die eine Funktion als Stop-Transfer-Domäne diskutiert wird (Nassoury *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden EST-Daten verschiedener Peridinin-haltiger Dinoflagellaten auf Proteine mit potentieller Plastidenlokalisation überprüft und von diesen die Proteine mit hydrophober Domäne in der Zielsteuerungssequenz analysiert. Dies führte bei einigen Proteinen zu einer Neubewertung der Klasseneinteilung, die ursprünglich durch Patron (Patron *et al.*, 2005) durchgeführt wurde. So wurde z.B. AtpH im Gegensatz zu Patron (dort Klasse I) (Patron *et al.*, 2005) hier der Klasse III zugeordnet.

4.3.2.1 Grüne Genomspuren in Proteinen der Klasse I Transitpeptide

Im Zuge der Analyse der Klasse I Transitpeptide wurde eine Tendenz für Proteine mit Klasse I Transitpeptiden hin zu einer bakteriellen oder ‚grünen‘ Herkunft deutlich (siehe Tabelle 3-6, Abbildung 3-9). Auch in vorherigen Studien wurden Proteine, die in dieser Arbeit in die Klasse I eingestuft wurden, als Proteine beschrieben, die aus einem potentiellen horizontalen Gentransfer (HGT) bzw. nicht ‚klassischen‘ endosymbiontischen Gentransfer (EGT) hervorgegangen sind. Das bedeutendste und auffälligste Beispiel stellt hier sicherlich die Form II RuBisCo dar. Diese scheint in einem Vorläufer der heutigen Alveolaten die Form I RuBisCo ersetzt zu haben, obwohl die Form II eine geringere Affinität zu CO₂ aufweist (Morse *et al.*, 1995). Weitere Beispiele sind aber auch GapDH und Rpl33 (Takishita *et al.*, 2004; Takishita *et al.*, 2008; Moszczynski *et al.*, 2012). Zudem wurden auch viele der hier als Klasse I beschriebenen Proteine in Moustafa *et al.* (Moustafa *et al.*, 2009) als Proteine mit ‚grüner‘ Herkunft in der Diatomee *P. tricornutum* beschrieben. Im Gegensatz dazu wurden zahlreiche

hier in Klasse III eingestuften Proteine als Proteine beschrieben, die deutlich von einer Rotalge abstammen bzw. eine gewisse Dinoflagellatenspezifität aufweisen (Fast *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008; Janouškovec *et al.*, 2010). Obwohl eine solche phylogenetische Einordnung sicher nicht für jedes Protein als absolut zu betrachten ist, ist die beschriebene Tendenz doch recht eindeutig. Es stellt sich daher die Frage, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Herkunft des Gens und Art des Transitpeptids besteht

Vor allem die Genomgröße der Dinoflagellaten spricht dafür, dass es nicht nur zu einem intensiven endosymbiontischen Gentransfer (EGT) gekommen ist (Hackett *et al.*, 2004), sondern auch HGT-Ereignisse dazu beigetragen haben. Wie bereits erwähnt, konnten zahlreiche ‚grüne‘ bzw. bakterielle Genomspuren in Dinoflagellaten identifiziert werden. Dies gilt allerdings auch für z.B. Diatomeen und *Chromera velia*, einem möglichen ‚Bindeglied‘ zwischen Apicomplexa und Dinoflagellaten (Frommolt *et al.*, 2008; Moustafa *et al.*, 2009; Woehle *et al.*, 2011).

Die Hypothesen zur Entstehung der Transitpeptide bzw. einer BTS sind sehr vielfältig. Sie reichen von zufälligem Erhalt durch Mutagenisierung (Cavalier-Smith, 2003) oder *frame-shifts* in Tandem duplizierten Genen (Ueda *et al.*, 2006) über ein Akquirieren über Introns bzw. ein „semi *exon-shuffling*“ (Kilian and Kroth, 2004) bis hin zu *exon-shuffling* und Rekrutierung zufälliger Sequenzregionen (Tonkin *et al.*, 2008). Weiterhin besteht die Frage, wann es zum Gentransfer dieser Gensequenzen gekommen ist. Zum einen kann dies vor der Etablierung der Rotalge als Organell erfolgt sein, durch z.B. eine zuvor aufgenommene Grünalge (Moustafa *et al.*, 2009), also eine serielle Endosymbiose. Allerdings ist auch vorstellbar, dass es vorhergehende ‚Endosymbioseversuche‘ gab, bei denen eine Grünalge involviert war, oder aber auch über Kleptoplastizität (Keeling, 2010; Johnson, 2011). Zum anderen können diese Gene auch nach der Etablierung des roten Endosymbionten als HGT aufgenommen und konstituiert worden sein. Dies scheint z.B. im Falle der Form II RuBisCo wahrscheinlich (sofern man einem monophyletischen Ursprung der Chromalveolaten ausgeht), da sie erst in einem Vorläufer der Alveolaten etabliert wurde (Morse *et al.*, 1995; Janouškovec *et al.*, 2010). Da die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL) ebenfalls den Proteinen mit Klasse I Transitpeptid angehört, wurde diese Zielsteuerungssequenz also auch nach einem HGT etabliert. Der beschriebene Aufbau der BTS macht weiterhin einen einheitlichen Mechanismus zur Propagierung dieser Signalsequenz wahrscheinlich, der dann gerade für Gene aus einem HGT zum Tragen kommen könnte. Wie eine solche Entstehung

einer Zielsteuerungssequenz mechanistisch erfolgt, ist doch letztendlich ungewiss. Allerdings eröffnet der Aufbau der Klasse I Transitpeptide die Möglichkeit, dass diese Gene auch aus einem HGT mit einem Organismus mit bereits sekundär evolvierter Plastide hervorgegangen sind. Das codierte Protein dieses Gen besäße bereits eine BTS und der mögliche Generierungsprozess für Zielsteuerungssequenzen in Dinoflagellaten könnte dann einen solchen, wie heute beobachtbaren, Aufbau zur Folge haben. In diesem Szenario wäre die hydrophobe Domäne also ein ehemaliges Signalpeptid, welches durch das angefügte Signal- und Transitpeptid eine neue Funktion erhalten würde. Dabei müsste davon ausgegangen werden, dass die ursprüngliche BTS für die Plastide mit drei Hüllmembranen nicht funktional war.

Betrachtet man dies im Zusammenhang mit dem äußerst reduzierten Plastidengenom, dargestellt durch die *minicircles*, wäre es vorstellbar, dass Peridinin-haltige Dinoflagellaten einen Weg gefunden haben einen HGT effizient zu nutzen (eventuell auch aus Organismen mit sekundärer Plastide), der dann zu Genen führt, die die notwendige Funktion in der Plastide erfüllen können. Das Zusammenspiel aus EGT und HGT würde dann eine solch starke Reduktion des Plastoms ermöglichen.

4.3.2.2 Aufbau und Eigenschaften der Klasse I Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Im Laufe der Analyse der plastidären Proteine mit hydrophober Domäne als Teil der BTS wurde deutlich, dass viele dieser Proteine einen Sequenzabschnitt unterschiedlicher Länge (ca. 10 – 60 Aminosäuren) zwischen dem Ende der hydrophoben Domäne (bestimmt durch TOPCONS) und dem Beginn des konservierten Sequenzbereichs des maturen Proteins besitzen (bestimmt über BLAST). Diese Sequenzabschnitte zeigen eine deutlich positive Ladung durch eine Häufung von vor allem Argininen und Lysinen (Tabellen 3-6 und 4-2). Weiterhin treten gehäuft Alanin, Valin und die hydroxylierten Aminosäuren Serin und Threonin auf (Abbildung 3-8). Damit tragen sie Merkmale, wie sie von Transitpeptiden bekannt sind (Patron and Waller, 2007; Felsner *et al.*, 2010). Aufgrund dessen wurde dieser Sequenzbereich der Klasse I Proteine als potentielles Transitpeptid 2 (*transit peptide like 2* - TPL2) bezeichnet (Abbildung 4-3). Um ein potentielles Transitpeptid darzustellen und als solches wirken zu können, muss der vorangehende Sequenzabschnitt in der Zelle prozessiert

werden. Daher wurden die hydrophoben Bereiche der Klasse I mit SignalP auf eine mögliche Schnittstelle für Signalpeptidasen untersucht. Die Vorhersagen lieferten hohe Wahrscheinlichkeiten für eine Schnittstelle durch Peptidasen, was auch durch das Weblogo (Abbildung 3-8) verdeutlicht wird, welches ein für Signalpeptidasen bekanntes AXA|-Motiv aufzeigt (Paetzel *et al.*, 2002) (Abbildung 4-3).

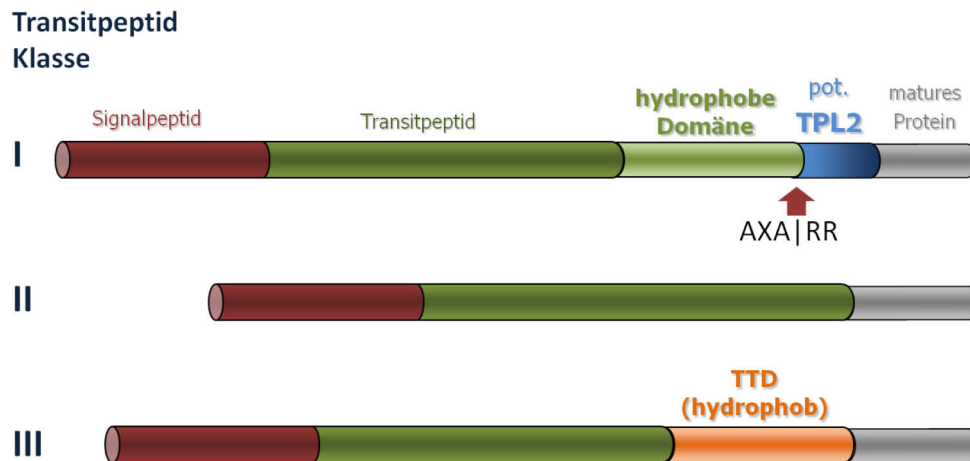


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der Transitpeptidklassen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Klassen der Transitpeptide aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit besonderem Fokus auf die Klasse I. Für diese konnte C-terminal der charakteristischen, hydrophoben Domäne eine Sequenzregion mit Eigenschaften ähnlich eines Transitpeptids identifiziert werden, die als TPL2 benannt wurde (TPL – *transit peptide like*). Der rote Pfeil kennzeichnet zusätzlich eine potentielle Schnittstelle einer Signalpeptidase (AXA|XX). RR steht hier stellvertretend für die in der TPL2 gehäuft auftretenden positiv-geladenen Aminosäuren. Auch die Transitpeptide der Klasse III besitzen einen hydrophoben Bereich, der jedoch eine Thylakoidzielsteuerungssequenz darstellt (TTD – *thylakoid targeting domain*). Klasse II Transitpeptiden weisen keinen hydrophoben Bereich in ihrer BTS auf.

Die beschriebenen Eigenschaften der hydrophoben Domäne und des TPL2 zeigen in ihrer Struktur allerdings einige Überschneidungen mit dem *twin arginine motif* (RR), einem Zielsteuerungsmerkmal für einen Thylakoidimport (Müller and Klösgen, 2005). Zum einen sind bei diesem Motiv die stärksten positiven Ladungen jedoch N-terminal des hydrophoben Bereichs zu finden (Albiniak *et al.*, 2012). Zum anderen wurde die sub-plastidäre Lokalisation der hier identifizierten Proteine mit den Datenbanken für *Arabidopsis thaliana* abgeglichen (TAIR, PPDB, AT_Chloro). Für ca. 75% der als Klasse I eingestuften Proteine wurde für die homologen Proteine aus *A. thaliana* eine stromale Lokalisation bestätigt. Damit besteht für diese Proteine keine Notwendigkeit für einen Import in die Thylakoide und macht für das potentielle TPL2 eine Rolle als Zielsteuerungssequenz wahrscheinlicher. Aus diesem Grund wurde das TPL2 auf eine mögliche Importkompetenz für den Import in primäre Plastiden getestet. Dazu wurden GFP-Fusionkonstrukte erstellt, die die BTS und ein Teil des muren Proteins von Psd oder Rpl33 mit schrittweisen N-terminalen Verkürzungen enthielten

(Abbildung 3-10). Auch hier wurden Mesophyll-Protoplasten von *A. thaliana* transfiziert und die Lokalisation des GFPs beobachtet (Abbildung 3-11). Die Bilder machen deutlich, dass auch die TPL2 keinen Import über das TOC/TIC-System der primären Plastiden der Landpflanzen vermitteln kann (Abbildung 3-11, Konstrukte IV). Weiterhin bestätigten sie, dass es auch durch die kanonischen Transitpeptide von PsaD und Rpl33 nicht zu einem Import von GFP in die Plastide kommt (Abbildung 3-11, Konstrukte II). Allerdings zeigen die Konstrukte in denen der hydrophobe Bereich der Klasse I BTS N-terminal frei zugänglich vorliegt (Abbildung 3-11, Konstrukte III) eine auffallende Lokalisation. Im Falle von Rpl33-III ist die GFP-Fluoreszenz ausschließlich um die Plastide herum lokalisiert. Auch für PsaD-III kann eine Tendenz für eine Lokalisation an der Plastide erkannt werden, diese ist jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt, da auch eine Lokalisation im Cytoplasma zu beobachten ist. Eine solche Lokalisation ähnelt der Lokalisation eines *outer envelope protein* (OEP), also eines Proteins der äußeren Plastidenmembran primärer Plastiden (*outer envelope membrane* - OEM). Aus den Beobachtungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- i) Die hydrophobe Domäne fungiert nicht als kanonisches Signalpeptid
- ii) Die Kombination aus hydrophober Domäne und TPL2 beinhaltet Zielsteuerungsinformationen, die eine Assoziation mit einer primären Plastide vermitteln

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des hydrophoben Bereichs und der Erkennung einer Schnittstelle für eine Signalpeptidase über SignalP bestand die Möglichkeit, dass diese Domäne, sofern sie vollständig N-terminal liegt, auch als Signalpeptid fungieren könnte. Dies hätte dann zu einem Import in das ER geführt und würde eine eher punktuerte Lokalisation des GFPs, ähnlich wie für die Konstrukte PsaD-I und Rpl33-I (Abbildung 3-11), nach sich ziehen.

Wie beschrieben zeigen die Konstrukte III eine verschieden stark ausgeprägte Lokalisation um die Plastide, wie man sie für ein Protein der äußeren Plastidenmembran primärer Plastiden erwarten würde. OEPs haben, im Vergleich mit üblichen Nukleus-codierten Plastidenproteinen, kein kanonisches Transitpeptid. Über den Import bzw. die Verankerung der OEPs ist bisher nur wenig bekannt, jedoch scheint es mehrere Transportwege, abhängig

von dem Aufbau der Zielsteuerungssequenz zu geben (Hofmann and Theg, 2005a). Die beschriebenen Charakteristika der Klasse I Proteine ähneln sehr den Zielsteuerungssequenzen von z.B. AtOEP7, PsOEP14 und OEP64. Diese Zielsteuerungssequenzen zeichnen sich durch eine N-terminale hydrophobe Domäne aus, die von positiven Ladungen umgeben ist (Li and Chen, 1996; Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). In Tabelle 4-2 sind Sequenzbereiche einiger Klasse I Proteine im Vergleich zu den benannten OEPs und auch ausgewählten Klasse III Proteinen dargestellt. Im Falle der OEPs primärer Plastiden ist die positive Ladung primär C-terminal von der hydrophoben Domäne zu beobachten. Auch im Falle der Proteine der Klasse I Transitpeptide sind positiv geladene Aminosäuren deutlich gehäuft C-terminal des hydrophoben Sequenzbereichs zu finden. Proteine der Klasse III haben C-terminal der hydrophoben Region kaum positiv geladene Aminosäuren, zudem folgt die konservierte Region des muren Proteins zumeist direkt hinter oder bereits als Teil der, in diesem Fall, potentiellen TTD.

	N-terminal	hydrophobe Domäne	C-terminal
Klasse I			
PsaD A.c.	ASPGALRGARVAHAGHQESS	SLSAASLTSAVVAAVGMALT	RSPSSVVRRAVPNTPKSSPDTLAGNRTEAS
Rpl33 A.c.	RYSSTEALPSSGRRAVSRVFGAASPAQGGGQ	AGSPVAAILLCTVAAAIGL	HVSRRSVSPSTRAVLCSNQLAPMPISAGISAL
RbcL A.c.	HPGIKAGQLRGVPMMDAAELLPTAEK	GASSSSVVLGSAVGLVGAGL	RSRNSRLAKKSGKRSIVARKALDQSSRYAD
GapDH L.c.	FVAPAPSLRRAQHKDIVTLARGQSEAKGS	TWLTSTSACALLIGAVAARAL	STSRSSSVTRRAVSMGINGFGIRGRQVARV
LHCP H.t.	FVPSIVGSSPAAQAALRGGAQSSSTST	GNFAASVATVAVAAVAAAG	VRRRQAKVAQNGARRDLAVAYEEGIELFDN
PsaC A.ca.	AAPLVSTRITTAVGSLQAFGAASGTQEGSQ	SSFAGVVVLGAALGAAAGW	AQRRGKLVARRSHAVKIYDTCIGCTLCVRA
OEPs			
OEP7 A.t. ¹	MGKTSGA	QATVVVAAMALGWLAIETAF	KPFLDKFRSSIDKSDPTKDPDDFDTAATAT
OEP14 P.s. ²	MGKA	EAVVVAGALAFVWLAIETAF	KPFLSQTRDSIDKSDPTKDPDDAPPPPPPE
OEP6.7 S.o. ³	MESVAKPATTKEGSAKQAA	IVVGVLALGWFAIQVAFILF	NKVRGGGSDKDDDDVNAFTPD
HKI S.o. ⁴	MRKA	AVGAADVCTAAVCAAAVLV	RQRMKSSSKWGRVMAILKELDDNCGTPLGK
OEP64 P.s. ⁵	MKSMA	SPSSQIWWILGLGLAGIYVLT	RKLTQAVKEDFGAFLKLLKLLPPPPAPPK
Klasse III			
psbO A. c.	APLGTSLRGQAEQILPTAVESEESYDAGS	WVRSVLGFGAALGLLAGIVAP	MSARAITSEQFEQLTYEQVKSGLANRCPT
petC A.c.	STDVASNIAMESMAGEYTGFPDMQRRRLTM	NLVCVAATAVPVVVLGGGYLY	FFYPPVPADSGAGVEVDINGNKIKLADWM
atpH H.t.	KAAQAPVQVPTAALSAAALVTPTMAHADDDG	VWIPALSAVGAGFAIGLAAIG	SGVGQGIASGRICDGISRQPEVADDLRGVL

Tabelle 4-2 Vergleich der Transitpeptide der Klassen I und III aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit plastidären OEPs aus Pflanzen

Die Tabelle vergleicht beschriebene OEPs aus Pflanzen (primäre Plastiden) mit den Transitpeptiden der Klassen I und III aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ausgehend von dem vorhergesagten hydrophoben Bereich (TOPCONS) (grün/orange). Im Falle der Klasse I und III Proteine stellt der N-terminale Bereich das eigentliche Transitpeptid dar, beidseitig sind maximal 30 Aminosäuren gezeigt. Positiv geladene Aminosäuren sind grau hinterlegt, der konservierte Bereich des muren Proteins ist in roter Schrift gezeigt. Im Falle der Klasse I Transitpeptide (TPL2) und der OEPs wird die Häufung positiv geladener Aminosäuren besonders C-terminal des hydrophoben Bereichs deutlich. Im Gegensatz dazu zeigen Klasse III Proteine nicht eine solche Ladungsverteilung und konservierte Proteinregionen folgen direkt nach oder sogar in dem hydrophoben Bereich. ¹ (Lee *et al.*, 2001) ² (Tu *et al.*, 2004) ³ (Schleiff *et al.*, 2001) ⁴ (Wiese *et al.*, 1999) ⁵ (Lee *et al.*, 2004)

Weiterhin weisen auch einige Proteine der äußeren Mitochondrienmembran diese beschriebenen Charakteristika auf und werden vermutlich über Tom40 und Mim1/Tom13 in die Membran inseriert (Ahting *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2008; Popov-Celeketi *et al.*, 2008). Die GFP-Lokalisationen in Abbildung 3-11 zeigen jedoch, dass die Konstrukte (III) mit hydrophober Domäne und potentiell TPL2 nicht zu den Mitochondrien dirigiert werden, sondern, in unterschiedlich starker Ausprägung, ausschließlich mit den Plastiden assoziieren. Dies bedeutet, dass diese Sequenzregion die nötigen Informationen erhalten muss, um eine Zielsteuerung hin zu den Plastiden zu gewährleisten. Wird der hydrophobe Bereich jedoch entfernt, erfolgt keine Assoziation mit der Plastidenmembran (Abbildung 3-11, Konstrukte IV), wie dies auch für die OEPS 7/14/64 beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Hofmann and Theg, 2005b). Die Untersuchungen zu diesen OEPs beschreiben weiterhin, dass die Insertion in die OEM der primären Plastiden anscheinend über TOC75 erfolgt, jedoch ohne Einbeziehung von TOC34 und TOC159 (Lee *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004). Damit gibt es zwischen der Insertions – bzw. Importmaschinerie dieser OEPs und sonstiger Plastidenproteine Überschneidungen, wobei OEPs nur ‚freies‘, nicht im TOC Komplex gebundenes, TOC75 und eventuell bisher nicht identifizierte Faktoren für die Insertion benötigen (Tu *et al.*, 2004). Die beschriebenen Ähnlichkeiten zwischen den OEPs und den Eigenschaften der Klasse I Transitpeptide aus Peridinin-haltigen Dinoflagellaten lassen einen davon abgeleiteten Importmechanismus möglich erscheinen (siehe 4.3.4). Im Falle der Klasse I Proteine ist im Gegensatz zu den OEPs jedoch aufgrund der potentiellen Schnittstelle einer Signalpeptidase (o.ä.) eine weitere Prozessierung möglich. Im Umkehrschluss würde dies auch für die Existenz eines Translokons der Omp85 Familie in der zweiten Plastidenmembran der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sprechen.

Ein solches Protein konnte zwar, wie oben beschrieben, in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Cryptophyten noch nicht identifiziert werden, die Vergleichbarkeit der Transitpeptiden der beiden Gruppen zu denen der Diatomeen, für die die Existenz eines solchen Proteins gezeigt wurde (Bullmann *et al.*, 2010), spricht jedoch für einen TOC-ähnlichen Mechanismus. Da auch in Mitochondrien und Bakterien diese Proteine eine bedeutende Rolle bei Insertion von Proteinen in die äußere Membran erfüllen (Rapaport and Neupert, 1999; Dembowski *et al.*, 2001; Krimmer *et al.*, 2001; Voulhox *et al.*, 2003), scheint dieser Mechanismus evolutionär konserviert zu sein.

4.3.2.3 Membraninsertion der Klasse I und III Proteine im Zuge des Proteinimports

Für ein Nukleus-codiertes Plastidenprotein der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wurde *in vitro* eine Insertion in die ER-Membran in einer Topologie eines Typ I – Membranproteins (N-innen, C außen) in Mikrosomen gezeigt (Nassoury *et al.*, 2003). Diese Experimente wurden mit dem Peridinin-Chlorophyll Bindeprotein (PCP) durchgeführt. Dieses wurde in dieser Arbeit aber auch von Patron (Patron *et al.*, 2005) der Klasse III Transitpeptide zugeordnet. Auch für Euglenophyten, die vergleichbare Zielsteuerungssequenzen für plastidäre Proteine und auch eine von drei Membranen umgebene Plastide besitzen, ist eine solche Typ I – Topologie aufgrund von *in vitro* Daten beschrieben worden (Sulli and Schwartzbach, 1996; Sulli *et al.*, 1999).

Es besteht demnach kein Hinweis darauf, dass auch Proteine mit Klasse I Transitpeptid in die Membran inseriert werden. Aufgrund dessen wurden die hydrophoben Domänen der hier untersuchten Proteine, je nach Klasse, auf ihre durchschnittlichen ΔG Werte für eine Membraninsertion überprüft (Hessa *et al.*, 2005; Hessa *et al.*, 2009) (Tabelle Anhang 9-5). Dabei gilt ein negativer ΔG -Wert als förderlich für eine Insertion an der ER-Membran. Ein positiver Wert macht eine Insertion in diese Membran unwahrscheinlicher, schließt sie jedoch auch nicht vollkommen aus. Die Untersuchung ergab für Klasse I Transitpeptide eine durchschnittliche Länge der TMD von 21,77 Aminosäuren und einen $\Delta G=+1,1125$, für Klasse III Transitpeptide ein Längendurchschnitt der TTD von 21,2 Aminosäuren und $\Delta G=+1,1471$. Dies zeigt zum einen, dass die hydrophoben Domänen untereinander vergleichbar sind. Zum anderen allerdings auch, dass sie relativ hohe ΔG -Werte für eine Membraninsertion aufweisen und damit eher unwahrscheinlicher in die ER-Membran inserieren (Hessa *et al.*, 2005; Hessa *et al.*, 2009). Erst kürzlich wurde für Pilze und Vertebraten gezeigt, dass Zusammensetzung und Länge der TMD von entscheidender Bedeutung für eine mögliche Insertion an einer spezifischen Zielmembran sind (Sharpe *et al.*, 2010). Bedeutende Faktoren sind dabei auch die Lipide der Zielmembran und diverse Insertionsfaktoren (Sharpe *et al.*, 2010; Elkehal *et al.*, 2012). Die Frage ist also, ob eine *in vitro* Insertion in Mikrosomen aus Hund (Nassoury *et al.*, 2003) den realen Bedingungen in der Zelle entspricht. So wird für OEPs der primären Plastiden vermutet, dass stark positive oder negative Ladungen im Umfeld einer Transmembrandomäne als Hinderungsgrund für eine Membraninsertion am ER

dienen (Tabelle 4-2) (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Im Falle der Transitpeptidklassen I und III der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind solche Ladungen bereits durch das der hydrophoben Domäne N-terminal liegende Transitpeptid gegeben. Für die Klasse I Proteine wird dies durch die C-terminal liegende TPL2 mit stark positiver Gesamtladung noch deutlicher. Auch die Klasse III Transitpeptide weisen C-terminale Ladungen auf, diese sind jedoch eher negative und weniger konzentriert (Tabelle 4-2).

Im Weiteren ist eine Thylakoidzielsteuerungsdomäne wie in Klasse III Transitpeptiden selbstverständlich kein Alleinstellungsmerkmal der Dinoflagellaten. Auch für z.B. Cryptophyten wurden dreiteilige Zielsteuerungssequenzen beschrieben, die durch eine klassische BTS mit zusätzlicher Thylakoidzielsteuerungssequenz gebildet werden (Broughton *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2007). In den beschriebenen Fällen konnte ein *twin-arginine* Motiv identifiziert werden, welches den Import über die TAT-Translokationsmaschinerie vermittelt und dieses Motiv weist ebenfalls einen hydrophoben Bereich auf (Albiniak *et al.*, 2012). Offensichtlich jedoch scheint diese hydrophobe TTD einen Import über die vier Membranen der Cryptophyten nicht zu behindern (Gould *et al.*, 2007) und somit wird eine Assoziation bzw. Insertion mit den zu passierenden Membranen anscheinend verhindert. Damit ist davon auszugehen, dass *in vivo* weitere Transportfaktoren existieren, die eine mögliche Insertion in eine solche Membran vermeiden.

Es ist also die Frage, warum im Falle der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ein solches Signalpeptid für den Thylakoidimport als eine Stop-Transferankerdomäne dienen und das Protein in der Membran verankern sollte. Wie Bozarth allerdings zeigte (Bozarth *et al.*, 2012), behindert die hydrophobe TTD von PsbO aus *A. carterae* den Import in die Plastide von *P. tricornutum* zumindest teilweise. Es ist vorstellbar, dass die Diatomee nicht die entsprechenden Faktoren aufweist um die Proteine der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten über die Membran zu delegieren. Im Weiteren führt eine Insertion in die ER-Membran zu Transportkonflikten an der äußeren Plastidenmembran, da das verankerte Protein nach Vesikelfusion für einen weiteren Transport in die Plastide zunächst aus der Membran gelöst werden müsste (siehe nächster Abschnitt, Abbildung 4-5).

Eine Verankerung vor allem der Klasse I Proteine in der Membran im Zuge des co-translationalen Imports in das ER und im Laufe des Transports zur Plastide kann also nicht als gesichert angesehen werden. Zahlreiche Gründe und Beispiele sprechen gegen einen solchen Verlauf des plastidären Proteinimports. Da Peridinin-haltige Dinoflagellaten bislang

nicht transfizierbar sind, beruhen die Erkenntnisse dazu bisher ausschließlich auf *in vitro* Daten und Erkenntnissen aus heterologen Systemen. Diese können jedoch die realen Gegebenheiten, die *in vivo* vorliegen, vermutlich nur unzureichend darstellen.

4.3.3 Inhibition des plastidären Proteinimports in *A. carterae* durch Brefeldin A

Nassoury und Kollegen beschrieben 2003 das erste Mal den Effekt von Brefeldin A auf Peridinin-haltige Dinoflagellaten und einen möglichen Einfluss auf den plastidären Proteinimport. Bozarth konnte die inhibierende Wirkung von Brefeldin A auf den Proteinimport in die Plastide bestätigen, zeigte allerdings auch, dass dadurch nicht alle Klassen der Transitpeptide gleichermaßen inhibiert werden (Bozarth, 2010). Er konnte zeigen, dass der Import der großen Untereinheit der RuBisCo (RbcL) in die Plastide, im Gegensatz zu den Proteinen PsbO und Prk, nicht durch Brefeldin A im gleichen Maße betroffen ist. Die untersuchten Proteine gehören jeweils den unterschiedlichen Klassen der Transitpeptide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten an (s.o.) (Patron *et al.*, 2005) (I – RbcL, II – Prk, III – PsbO) und wurden auch in dieser Arbeit diesen Klassen zugeordnet (s. Abschnitt 3.3.2.1, Tabelle 3-6). Da Brefeldin A den Transport über den Golgi-Apparat inhibiert (Dinter and Berger, 1998; Nebenfuhr *et al.*, 2002; Ritzenthaler *et al.*, 2002) postulierte er, dass die Proteine der Klasse I Transitpeptide über eine Transportroute direkt vom ER zur Plastide transportiert werden, im Gegensatz zu Proteinen der Klassen II und III, deren Transport über den Golgi erfolgt (Bozarth, 2010) (Abbildung 4-4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, wie oben beschrieben, weitere Proteine den verschiedenen Klassen zugeordnet bzw. neu klassifiziert (s. Abschnitt 3.3.2.1). Auf Grundlage dieser Klassifizierung wurden Proteine der verschiedenen Klassen ausgewählt (I - PsdD, II - AtpC, III – PetC) um den Einfluss auf ihren Proteinimport in die Plastide mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen zu untersuchen. Dabei war vor allem von Interesse, ob die beschriebenen Beobachtungen Bozarth's (Bozarth, 2010) , dass der plastidäre Proteinimport dieser Klasse nicht von Brefeldin A inhibiert wird und somit eventuell eine andere Route zur Plastide verwendet, auf alle Proteine mit Klasse I Transitpeptid zutreffen.

Zu den *A. carterae* Kulturen wurde 1 h vor Beginn der Lichtphase Brefeldin A in einer Endkonzentration von $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt und insgesamt für 5 h inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, einer Gefriersubstitution unterzogen und fixiert. Die Ultradünnschnitte wurden zur Immunogold-Markierung mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Die Aufnahmen aus dem Elektronenmikroskop (Abbildungen 3-12) zeigen, dass PsaD, im Gegensatz zu AtpC und PetC, keine Veränderung im Lokalisationsmuster der Goldmarkierungen nach Brefeldin A Behandlung zeigt. Sowohl mit, als auch ohne Brefeldin A in der Kultur lokalisieren mindestens 80% der Goldmarkierungen von PsaD (Klasse I) in der Plastide. Im Gegensatz dazu zeigen die Goldlokalisationen von AtpC (Klasse II) und PetC

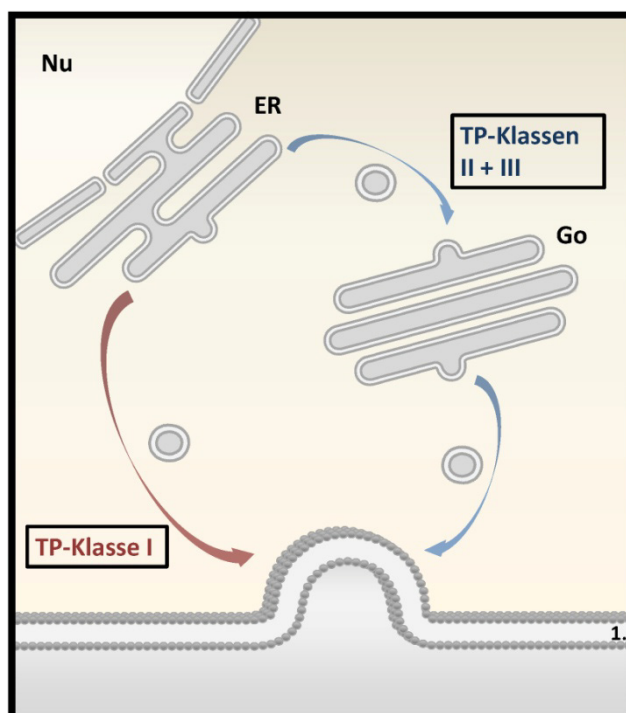


Abbildung 4-4 Schematische Darstellung verschiedener plastidärer Importwege in Peridinin-haltige Dinoflagellaten

Nach dem co-translationalen Import in das ER erfolgt der Import nukleus-codierter Plastidenproteine klassenabhängig. Klasse I wird direkt vom ER zur Plastide transpotiert, die Klassen II und III traversieren den Golgi-Apparat.

(Klasse III) deutliche Veränderung und lokalisieren nach Behandlung mit Brefeldin A mehrheitlich nicht mehr in der Plastide, sondern vielmehr im Endomembransystem der Zelle. Dies deckt sich mit den Beobachtungen Bozarth's (Bozarth, 2010) für die Proteine RbcL, Prk und PsbO.

Damit bestätigen sich die Ergebnisse Bozarth's, dass der Proteinimport einiger Proteine in die Plastide unempfindlich gegenüber einer Brefeldin A Behandlung

ist, auch für PsaD. Somit scheinen die Proteine der Klasse I Transitpeptide für ihren plastidären Import nicht den Golgi zu traversieren und nutzen vermutlich einen von dem der Klassen II und III

abweichenden Importweg und/oder -mechanismus (Bozarth, 2010) (Abbildung 4-4). Damit weisen Proteine mit Klasse I Transitpeptid nicht nur einen tendenziell anderen Ursprung und Aufbau der Zielsteuerungssequenz auf als Klasse II und III Proteine, sondern unterscheiden sich auch grundsätzlich im Importmechanismus.

4.3.4 Entwicklung eines modifizierten Modells für den plastidären Proteinimport in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Die Nukleus-codierten Plastidenproteine der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten lassen sich aufgrund des Aufbaus bzw. der Eigenschaften ihrer Zielsteuerungssequenzen in drei Klassen unterteilen (Abbildung 4-3). In dieser Arbeit wurde der Fokus vor allem auf die Klasse I Transitpeptide gelegt. Es zeigte sich, dass die hydrophobe Domäne eine potentielle Schnittstelle für eine Signalpeptidase enthält und C-terminal dieser Schnittstelle nicht-konservierte, vor allem positiv-geladene und hydroxylierte Aminosäuren aufweist, die als potentielles TPL2 eingestuft wurden (Abbildung 4-3, Tabelle 4-2). Weiterhin zeigte sich durch Studien in heterologen und im homologen System, dass diese Sequenzbereiche gewissen Zielsteuerungsinformationen enthalten, die eventuell jedoch im Zuge des co-translationalen Imports nicht zu einer Membraninsertion am ER führen. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde ein neues Arbeitsmodell für den Import Nukleus-codierter Plastidenproteine in die komplexe Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit besonderem Fokus auf die Klasse I Proteine entwickelt (Abbildung 4-5).

Nach dem co-translationalen Import in das ER, vermittelt über das Signalpeptid der BTS, wird das Signalpeptid abgespalten und die Proteine mit Transitpeptid der Klassen I und II liegen als lösliche Proteine im ER-Lumen vor (dies gilt eventuell auch Klasse III, diese Klasse ist in Abbildung 4-5 jedoch exemplarisch als verankert dargestellt, siehe unten). Daraufhin werden sie durch einen bisher unbekannten Mechanismus in Transportvesikel rekrutiert. Dabei verläuft der Transport der Klasse I Proteine direkt vom ER zur Plastide, die Proteine mit Transitpeptid der Klasse II traversieren, ebenso wie die Proteine mit Transitpeptid Klasse III, den Golgi auf ihrem Transportweg zur Plastide. Letztere sind eventuell beim Import in das ER mit ihrer hydrophoben TTD in der Membran verankert worden (siehe oben) und weisen nun eine Topologie auf, in der der funktionale Bereich des Proteins in das Cytosol ragt. Ebendiese Topologie behalten sie auf ihrem Transport auch im Transportvesikel bei und sind somit nach der Vesikelfusion in der äußeren Plastidenmembran noch auf diese Weise verankert. Es bleibt unklar, wie in der Membran verankerte Proteine aus der Membran gelöst werden, um über die weiteren Plastidenmembranen transportiert werden zu können.

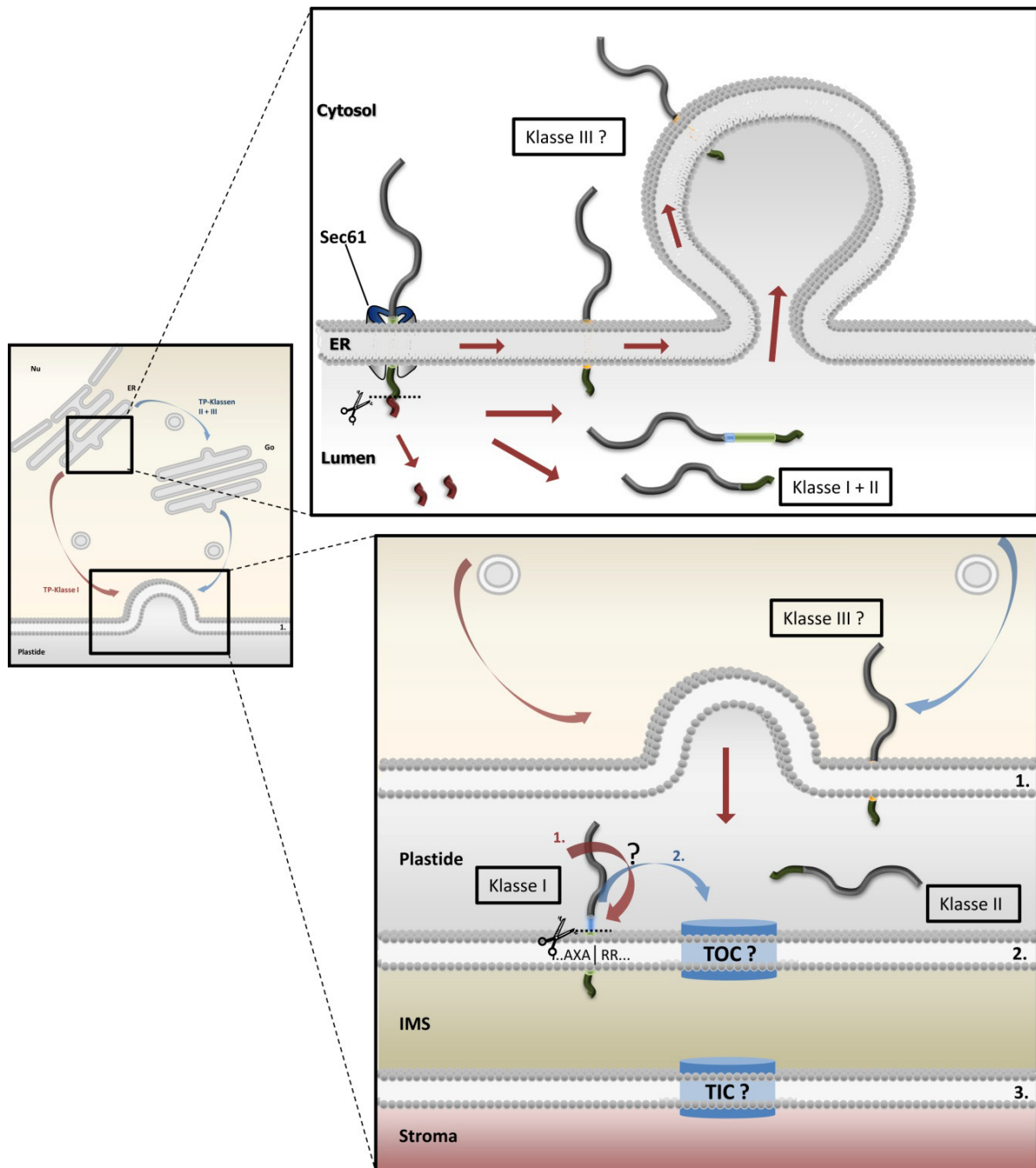


Abbildung 4-5 Schematische Darstellung für ein Model des plastidären Proteinimports in Peridinin-haltige Dinoflagellaten

Nach dem co-translationalen Import in das ER liegen die Proteine der Klasse I und II Transitpeptide als lösliche Proteine im ER-Lumen vor und werden durch einen bisher unbekannten Mechanismus in Transportvesikel rekrutiert. Klasse III wird eventuell durch die hydrophobe TTD mit dem murenen Teil des Proteins (C-Terminus) im Cytosol in der ER-Membran verankert und ebenfalls in Transportvesikel aufgenommen, jedoch Membran-gebunden. Klasse I Proteine werden direkt vom ER zur Plastide dirigiert und für die Klassen II und III erfolgt der Transport über den Golgi-Apparat. Nach der Fusion der Transportvesikel mit der äußersten Plastidenmembran liegen die Proteine der Klassen I und II erneut löslich vor, Klasse III ist in gleichbleibender Topologie Membran-verankert. Klasse II könnte nun direkt über die weiteren Membranen transportiert werden, möglicherweise über TOC bzw. TIC-homologe Proteine. Im Falle der Klasse I Proteine könnte die hydrophobe Domäne eine Insertion in die zweite Plastidenmembran bewirken (1.) (ähnlich der OEPs der primären Plastiden und damit über ein Protein der Omp85-Familie), wird von einer, bisher unbekannten, Signalpeptidase am AXA|RR-Motif geschnitten und es erfolgt der weitere Transport über die Plastidenmembranen zwei und drei mittels des TPL2 (2.). Wie der Transport der Klasse III Proteine vollzogen wird bzw. wie diese Proteine aus der Membran gelöst werden, ist ungeklärt.

Ihre hydrophobe Domäne, die im Falle der Klasse III Teil einer Thylakoidzielsteuerungssequenz ist, wird jedoch noch für einen Transport über die Thylakoidmembran benötigt und kann daher nicht abgetrennt werden.

Die Verankerung in der Membran ist für den weiteren Transport also hinderlich. Wie oben beschrieben, werden auch in anderen Organismen mit sekundärer Plastide Proteine mit TTD nicht in der Membran verankert (Gould *et al.*, 2007). Sollten die Klasse III Proteine jedoch nicht verankert werden, also als lösliches Protein transportiert werden, wären sie frei für eine Interaktion mit einem möglichen Translokton der zweiten Plastidenmembran.

Nach der Fusion des Transportvesikels liegen Klasse I und II Proteine zunächst wieder als lösliche Proteine vor. Die Proteine mit Transitpeptiden der Klasse II treten mittels ihres Transitpeptids in Kontakt mit einem Translokton der zweiten Plastidenmembran und werden über die nachfolgenden Membranen transportiert. Proteine mit Klasse I Transitpeptid werden möglicherweise jedoch, ähnlich eines OEPs primärer Plastiden, mittels ihrer hydrophoben Domäne in der zweiten Membran verankert (Abbildung 4-5, 1.). Eine, eventuell Membran-gebundene Peptidase würde dann an dem AXAIRR-Motiv (RR steht hier stellvertretend für die stark positive Ladung der TPL2) die hydrophobe Domäne abtrennen und das TPL2 wäre zugänglich um einen weiteren Transport über die nachfolgenden Membranen mittels Translokatoren zu vermitteln (Abbildung 4-5, 2.).

4.3.5 Implikationen für die evolutionäre Entstehung der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Im Falle der Proteine mit Klasse I Transitpeptid ist es eine entscheidende Frage, ob sie mittels ihrer hydrophoben Domäne in die nachfolgende Membran (zweite Plastidenmembran der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten) inseriert werden und sich demnach wie ein OEP bei primären Plastiden verhalten. Sollte dies der Fall sein, müsste davon ausgegangen werden, dass die zweite Plastidenmembran in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ähnliche Eigenschaften wie die äußere Membran primärer Plastiden hat. Weiterhin werden OEPs vermutlich auch über TOC75 inseriert und damit ließe sich schließen, dass auch in der zweiten Plastidenmembran der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ein Translokton der Omp85-Familie vorliegt. Die beiden inneren Membranen wären somit also den einer primären Plastide homolog.

Auch da der monophyletische Ursprung der als Chromalveolaten benannten Supergruppe (Cavalier-Smith, 1999) immer mehr in Frage steht (Okamoto *et al.*, 2009; Janouškovec *et al.*, 2010; Dorrell and Smith, 2011), ist auch der Ursprung der Plastide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten nicht vollständig geklärt. Gerade da sie in der ‚roten Linie‘ in ihrer Membranarchitektur und der Organisation des Plastidengenoms in *minicircles* einzigartig ist, nimmt die Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eine Sonderstellung ein. Allerdings erscheint der monophyletische Ursprung der Alveolaten mit Apicomplexa (photosynthetisch inaktiv), *Chromera velia*, Ciliaten (die ihre Plastide verloren haben) und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten als weitgehend abgesichert (Moore *et al.*, 2008; Lukeš *et al.*, 2009; Janouškovec *et al.*, 2010). Demnach wurde die komplexe Plastide der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten um eine weitere Membran reduziert. Welche Membran im Vergleich zu Plastiden mit vier umgebenden Membranen jedoch entfallen ist, kann nicht mit letzter Gewissheit bestimmt werden, anhand der bisherigen Daten scheint jedoch ein Verlust der PPM am wahrscheinlichsten. Die äußere Membran sollte erhalten geblieben sein, allein schon um einen Vesikeltransport innerhalb des Endomembransystems zu gewährleisten. Dennoch kann die Plastide, gerade aufgrund ihrer Membranorganisation, auch aus einer primären Endosymbiose hervorgegangen sein. Dies widerspricht jedoch einer Monophylie der Alveolaten. Eine weitere Möglichkeit, die eine solche Membranarchitektur zur Folge haben könnte, ist eine Etablierung nach der Aufnahme durch Kleptoplastidizität bzw. Myzocytose, wie es für andere Dinoflagellaten beschrieben wurde (Schnepf and Deichgräber, 1984; Keeling, 2010). Letztere Variante würde, sofern die Plastide aus einem Vorgänger der Alveolaten generiert wurde, einer Monophylie der Alveolaten nicht entgegenstehen. Die benannten Varianten hätten aber auch zur Folge, dass die inneren beiden Membranen vermutlich den Hüllmembranen einer primären Plastide homolog sind und damit vermutlich auch eine von TOC/TIC abgeleitete Importmaschinerie besitzen. Für eine solche Importmaschinerie spricht zum einen die Zielsteuerung Nukleus-codierter Plastidenproteine über Transitpeptide, die trotz der beschriebenen, besonderen Eigenschaften noch viele ähnliche Merkmale wie Transitpeptide vergleichbarer Organismen aufweisen. Zum anderen decken sich, wie oben beschrieben, auch die Eigenschaften der Klasse I Transitpeptide mit der Möglichkeit eines Imports über ein Translokon der Omp85-Familie.

Auch in der ‚grünen Linie‘ kam es in den Euglenophyten zur Etablierung einer komplexen Plastide, die von drei Membranen umgeben ist. Dabei ist bemerkenswert, dass es in diesen Organismen zur Ausbildung sehr ähnlicher Zielsteuerungssequenzen gekommen ist (Sulli and Schwartzbach, 1995; Sulli and Schwartzbach, 1996; Sláviková *et al.*, 2005), obwohl anscheinend weder von Seiten des sekundären Wirtes noch des Endosymbionten wirkliche Gemeinsamkeiten mit den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten herrschen (Lukeš *et al.*, 2009). Es ist in diesem Fall also eher von konvergenter Evolution auszugehen. Demnach scheint der beschriebene und teils komplexe Aufbau der Zielsteuerungssequenzen für den plastidären Proteinimport direkt aus der Membranarchitektur zu resultieren bzw. nötig zu sein um einen Import in die Plastide mit drei Membranen zu gewährleisten.

Nach wie vor ist das Wissen sowohl über die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten als auch die Euglenophyten äußerst begrenzt. Ein entscheidender Schritt in dem Verständnis der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wird vermutlich erst mit der Entschlüsselung eines vollständigen Genoms gelingen. Bisher standen dem vor allem die enorme Genomgröße und die teilweise stark repetitiven Sequenzabschnitte entgegen. Die neueren Methoden der *next-generation* Sequenzierungen sollten Fortschritte in diesem Feld ermöglichen und somit neue Einblicke in die zelluläre Organisation, wie z.B. Genomorganisation und plastidären Proteinimport, dieser bemerkenswerten und ökologisch bedeutenden Organismen gewähren.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Evolution der plastidären RNA-Edierung und dem evolutionären Hintergrund der komplexen Plastide in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten. Das Plastidengenom des Lebermooses *P. endiviifolia* wurde vollständig sequenziert (120554 bp) und C→U Edierung konnte an 54 Stellen nachgewiesen werden. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Edierungen stützt dies einen sekundären Verlust der RNA-Edierung in dem Lebermoos *M. polymorpha*. Weiterhin sind die Edierungsstellen in *P. endiviifolia* auf einen Sequenzkontext mit geringerer Mutationsrate konzentriert. Dadurch erfüllen sie die Kriterien für das Modell der Entstehung der RNA-Edierung nach Tillich (Tillich *et al.*, 2006). Ein RNA-Edierungssystem entwickelte sich um Mutationen der DNA auf RNA Ebene zu kurieren. Rückmutationen, teilweise begünstigt durch Zeiten dynamischer Sequenzevolution, führten zu den heute beobachtbaren Editotypen bzw. zum Verlust der Edierung in *M. polymorpha*.

Außerdem wurde die plastidäre Genomreduktion der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten untersucht. Mittels Transposonmutagenese konnten *minicircles* aus *A. carterae* isoliert werden, die unter anderem eine Stammspezifität der *core*-Region verdeutlichen. Die *minicircles* zeigen eine ausgesprochene Varianz und ihre möglichen Funktionen, unter anderem als mögliches Gen-*shuttle*, werden diskutiert.

Im Zuge der Betrachtung des plastidären Proteinimports zeigte sich, dass die Transitpeptide Nukleus-codierter Plastidenproteine der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Chromisten, entgegen bisherigen *in vitro* Daten, keinen Import in die primäre Plastide von Landpflanzen vermitteln können und die sogenannten Klasse I Transitpeptide weitere potentielle Zielsteuerungsinformationen enthalten (TPL2), welche die nötigen Informationen für eine Assoziation mit einer primären Plastide tragen. Proteine dieser Klasse weisen häufig eine größere Homologie zu ‚grünen Genen‘ auf, was auf einen Ursprung aus einem potentiellen horizontalen Gentransfer schließen lässt. Zusätzlich konnte durch elektronenmikroskopische Studien bestätigt werden, dass Proteine mit Klasse I Transitpeptid nicht sensitiv für eine Inhibition mit Brefeldin A sind und somit einen vom Golgi-Apparat unabhängigen Transportweg in die komplexe Plastide zu nutzen scheinen. Diese Klasse zeigt also Besonderheiten im plastidären Proteinimport, womöglich resultierend aus einem abweichenden evolutionären Ursprung.

6 Summary

Topics of this thesis are the evolution RNA-editing in plastids of land plants and the evolutionary background of the complex plastid in peridinin-containing dinoflagellates.

The plastid genome of *P. endiviifolia* was completely sequenced (120554 bp) and transcripts of protein-coding genes showed only C→U RNA-editing at 54 sites. The relatively low number of editing sites supports the secondary loss of RNA-editing in *M. polymorpha* and, furthermore, editing sites are predominantly found in a sequence context known for low re-mutation rates. For this reason RNA-editing in *P. endiviifolia* meets the criteria for the evolution of chloroplast RNA-editing in land plants stated by Tillich (Tillich *et al.*, 2006). RNA-editing was established to cure DNA mutations, which occurred in the plastid genomes of the first land plants, on the level of RNA. Re-mutations, eventually fostered by times of accelerated evolution rates, can cure these mutations on DNA level and thereby lead to the editotypes we observe today or even to a complete loss of RNA-editing as in *M. polymorpha*. Another topic was the plastidial genome reduction and the protein import in the complex plastid of peridinin-containing dinoflagellates. The method of transposon mutagenesis was used to isolate minicircles of *A. carterae*, which revealed that the core region of minicircles is at least subspecies-specific. Minicircles are extraordinary variant and their possible roles, as for example gene-shuttle, are discussed.

Studies of protein import showed, that, in contrast to previous *in vitro* data, transit peptides of nucleus-encoded plastid proteins of peridinin-containing dinoflagellates and cromists were not able to mediate import into the primary plastid of land plants *in vivo*. For so called class I transit peptides potential additional targeting sequences were identified, named TPL2, which contained the necessary targeting information for directing proteins towards the primary plastid of land plants as it is known from proteins of the outer envelope membrane. Furthermore, class I proteins seem to have a phylogenetic bias towards the 'green line' of plastids indicating a possible origin via horizontal gene transfer. Finally, electron microscopy showed the insensitivity of class I protein transport to inhibition with Brefeldin A suggesting an alternative transport route for this class of transit peptides, most probably directly from the ER to the complex plastid. Therefore, proteins with class I transit peptide show specific transport mechanism for protein import into the plastid, potentially as a result of particular evolutionary origin.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Pflanzenmaterial und Organismen

Das Lebermoos *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort wurde vom Botanischen Garten Marburg bezogen und bei 20°C unter einem natürlichen Licht-/Dunkelrhythmus gehalten. Zusätzlich wurde Pflanzenmaterial in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Amphidinium carterae (Hulburt) stammt aus der Algenkultur Sammlung Marburg (Stamm CCAM0512) und wurde in f/2-Medium bei 12/12 Licht-/Dunkelrhythmus und bei 20°C kultiviert. Die Kulturen wurden alle zwei bis drei Wochen zur Stammhaltung überimpft.

Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) CCAP1055/1 wurde in f/2-Medium im Dauerlicht (8000-10000 Lux) bei 22 °C im Klimaschrank kultiviert. Flüssigkulturen wurden mit 50 rpm geschwenkt und nach 1-2 Wochen geerntet (10 min, 1500 x g, RT). f/2-Platten enthielten 1,3 % Agar-Agar, für transformierte Kulturen wurde zusätzlich 75 µg/ml Zeozin zugegeben. Die Kulturen wurden zur Stammhaltung regelmäßig überimpft.

Arabidopsis thaliana wurde unter Kurztag (8/16 Licht-/Dunkelrhythmus) bei 20°C und ca. 55% relativer Luftfeuchte auf Erde gehalten.

Escherichia coli Top10 Invitrogen:

F- *mcrA* Δ (*mrrhsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Strr) *endA1* *nupG*

TransfoMax™ EC100D™ *pir*-116 elektrokompetenten Zellen (Epicentre, Madison, USA)

7.1.2 Kits

Kit	Hersteller
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	GE-Healthcare (Freiburg)
GeneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
Gel Extraction Kit	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
JETsorb DNA Extraction Kit	Genomed (Löhne)
PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren)
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
HiYield PCR Clean-Up and Gel-Extraction Kit	SLG (Gauting)
Omniscript Reverse Transcription	Qiagen (Hilden)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)

7.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I RNase free	Roche (Mannheim)
DNase I RNase free	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
Proteinase K	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
Restriktionsenzyme und Puffer	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
RNAse A	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
RNAse T1	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Rot)
Taq DNA Polymerase	Biotoools (Madrid, Spanien)

7.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 377 Sequenzierautomat	Applied Bioscience (Darmstadt)
Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad (München)
BIO-VISION 1000 Video-Dokumentationssystem	PEQLAB (Erlangen)
Electrophoresis Power Supply EPS 301/EPS 601	Amersham Pharmacia (Nümbrecht)
Electrophoresis Power Supply GPS 200/400	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Elektroporator GenePulser / GenePulser Controller	BioRad, München
Frenchpress SLM-AMINCO 4-3399	SLM-Aminco Instruments (Urbana, USA)
Hybridisierungssofen 400 HY-E	Bachofer (Reutlingen)
Konfokales Laserscanmikroskop (KLSM) Leica TCS SP2	Leica (Wetzlar)
Mastercycler <i>Gradient / personal</i>	Eppendorf (Hamburg)
Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Schüttler Certomat R	Braun Biotech (Melsungen)
TE 77 Semi-dry Transfer Unit	GE Healthcare (Freiburg)
Thermomixer <i>comfort/compact</i>	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>mini Spin plus</i>	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Transmissions-Elektronenmikroskop EM2100	Jeol (Eching)
TRM-V Taumelschüttler	MAGV (Rabenau)
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman-Coulter (Krefeld)
UV-Lampe Desaga MinUVIS 254 nm/366 nm	Altmann Analytik (München)
Vortexer Reax 2000	Heidolph (Schwabach)
Zellmühle MM 200	Retsch (Haan)
Zentrifuge Hettrich Mikro 22R	Hettrich (Tuttlingen)
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Eppendorf 5810R	Eppendorf (Hamburg)

7.1.5 Membranen, Filter und Photomaterialien

Material	Hersteller
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel (Düren)
FP 30/0.2 CA-S - 0.2µm Sterilfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Fuji-Medical-X-ray-Film, 100 NIF 30 x 40 cm	Fuji Film (Düsseldorf)
Röntgenfilmentwickler	Kodak (Stuttgart)
Röntgenfilmfixierer	Kodak (Stuttgart)
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell (Dassel)

7.1.6 Größenstandards

Als Längenstandard für Nukleinsäuren wurde der *GeneRuler Express DNA Ladder*, *GeneRuler 1kB Plus DNA Ladder* und der λ -DNA/*EcoRI-HindIII Marker* von Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Roth) verwendet.

Als Größenstandard für SDS-Proteingele diene der *PageRuler PreStained Protein Ladder* von Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon Roth).

7.1.7 Oligonukleotide

Aufgrund der Anzahl der verwendeten Oligonukleotide sind die einzelnen Primer mit ihrer jeweiligen Sequenz im Anhang aufgeführt. Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

7.1.8 Software und digitale Ressourcen

Software	Hersteller
Bioedit	Ibis Therapeutics (Carlsbad, USA)
GeneDoc	http://www.psc.edu/biomed/genedoc
Sequencher 4.7-5.0	Gene Code Corporation (Ann Arbor, USA)
MEGA 5	(Tamura <i>et al.</i> , 2011)

Resource	Adresse
AT_Chloro (Ferro <i>et al.</i> , 2010)	http://www.grenoble.prabi.fr/at_chloro/
ChloroP (Emanuelsson <i>et al.</i> , 1999)	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
<i>Cyanidioschyzon merolae</i> Genome Project	http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/
Expasy Tools	http://www.expasy.ch/tools/
<i>Galdieria sulphuraria</i> Genomprojekt	http://genomics.msu.edu/galdieria
Δ G prediction (Hessa <i>et al.</i> , 2005; Hessa <i>et al.</i> , 2009)	http://dgpred.cbr.su.se/
Mobyle Institut Pasteur	http://mobyle.pasteur.fr
NCBI (Datenbanken und BLAST (Altschul <i>et al.</i> , 1990))	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OGDraw (Lohse <i>et al.</i> , 2007)	http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/index.shtml
PPDB (Sun <i>et al.</i> , 2009)	http://ppdb.tc.cornell.edu/
TAIR	http://www.arabidopsis.org/
TargetP (Nielsen <i>et al.</i> , 1997; Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000)	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
TOPCONS (Bernsel <i>et al.</i> , 2009)	http://topcons.net/
tRNAscan-SE (Schattner <i>et al.</i> , 2005)	http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/
SignalP 3.0 (Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/
SOSUI (Hirokawa <i>et al.</i> , 1998)	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html
SYM-BLAST	https://131.204.120.103/srsantos/symbiodinium/blast/blast_cs.html

7.1.9 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Chemikalien und Verbrauchsmittel wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Merck Biosciences (Darmstadt) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

7.1.10 Vektoren

Zur Ligation von PCR-Produkten wurde der *pJet1.2/blunt cloning vector* verwendet.

Der pPha-T1-Vektor zur Transfektion von *P. tricornutum* wurde bereitgestellt von Peter Kroth, Universität Konstanz (siehe (Apt *et al.*, 1996); NCBI GenBank: AF219942.1). Die Vektoren pPha-NR (Amp_r, Zeo_r, P_{NR} + T_{NR}) und pPha-Dual (2xNR Amp_r, Zeo_r, P_{NR}+T_{NR}(für MCS I+II)) sind modifizierte Varianten des pPha-T1-Vektors (NCBI GenBank: pPha-NR JN180663.1, pPha-Dual [2xNR] JN180664.1).

7.1.11 Antikörper

Die dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden im Folgenden unter Angabe der anwendungsspezifischen Verdünnungen aufgelistet, wenn nicht anders vermerkt wurden sie bei Agrisera (Vännäs, Schweden) bezogen.

Primäre Antikörper:

αAtpB (WB 1:5000), αAtpC (WB 1:2000), αExocellulase (Eurogentec) Epitop QQAGSQKQEEHVPLC (WB: 1:500, IP: 1:10), αPsaD (WB 1:2000), αPsbB (WB 1:1000), αGFP (Biomol) (WB 1:3000), αPetC (WB 1:1000), αPsbO (Eurogentec) Epitop PSYRTGGFLDPKGRG (WB: 1:1000, IP: 1:10, EM: 1:50), αPrk (Eurogentec) Epitope LDDYHTNDRAGRKAT (WB: 1:1000, IP: 1:10, EM: 1:50), αRbcL (WB 1:3000), αSec61A (USBiological) (WB 1:1000)

Sekundäre Antikörper: α *rabbit* HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich), α *goat* HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich) (WB 1:10000), α *rabbit* an 30 nm Goldpartikel gekoppelt (Biocell, EM: 1:140)

7.1.12 Medien

Medium für *E. coli*

LB-Medium (Angaben pro l) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Selektionsmarker	Ampicillin 50 µg/ml
	oder	Kanamycin 10 µg/ml

Zur Herstellung von LBPlatten wurden 2% (w/v) Agar auf einen Liter dem Medium zugesetzt. Für Selektionsplatten wurde nach dem Autoklavieren Ampicillin zugegeben, sobald das Medium auf ungefähr 50°C heruntergekühlt war.

Medium für *A. carterae*

f/2 Medium pH 7,2	5 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	3 % (w/v)	Meersalz (<i>tropic marine</i>)
	883 µM	NaNO ₃
	36 µM	NaH ₂ PO ₄

Medium für *P. tricornutum*

f/2-Medium pH 7	5 mM	Tris/HCl pH 8
	1.66 % (w/v)	Meersalz (<i>tropic marine</i>)
	880 µM	NaNO ₃
oder	1,5 µM	NH ₄ Cl
	36 µM	NaH ₂ PO ₄

vor der Verwendung wurde das Medium jeweils 1:1000 mit steriler f/2 – Spurenelement- und Vitaminstocklösung versetzt

f/2 Spurenelementlösung	11,65 mM	FeCl ₃
	11,71 mM	Na ₂ EDTA
	39 µM	CuSO ₄
	77 µM	ZnSO ₄
	42 µM	CoCl ₂
	910 µM	MnCl ₂
	26 µM	Na ₂ MoO ₄
f/2 Vitaminlösung	2 µM	Biotin
	0,37 µM	Cyanocobalmin
	297 µM	Thiamin-HCl

7.2 Methoden

7.2.1 Nukleinsäureanalytik

7.2.1.1 Isolation von DNA

Für die DNA Isolation aus *P. endiviifolia* wurden 100mg Pflanzenmaterial unter Stickstoff im Mörser zerkleinert. Die Isolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Doyle und Doyle (Doyle and Doyle, 1990). Das Pflanzenmaterial wurde noch im Mörser mit 600 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und weitergemörser. Nach Überführung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und kräftigem Mischen wurde die Suspension bei 60°C für eine Stunde inkubiert.

Für den Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* wurden 50ml Algenkultur durch Zentrifugation (3500 x g / 10 min / 4 °C) pelletiert, in 1,5 ml f/2 Medium resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, pelletiert und 1 x mit f/2-Medium gewaschen. Anschließend wurde das Algenpellet in 800 µl CTAB-Extraktionspuffer resuspendiert und für eine Stunde bei 70 °C inkubiert.

Nach zweifacher Chloroform-Extraktion (siehe 7.2.1.3.1) wurde für beide Organismen eine Isopropanolfällung durchgeführt. Dazu wurde nach den Extraktionsschritten die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 7/10 Volumen Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (20000 x g / 30 min / 4 °C) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Nukleinsäurepellet mit 70% Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 20 – 50 µl H₂O_{bidest.} resuspendiert.

CTAB – Extraktionspuffer 2% (w/v) N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)

1,4M NaCl

100mM Tris/HCl pH8,0

20mM EDTA

100mM β-Mercaptoethanol (Zugabe vor Verwendung)

7.2.1.2 Isolation von RNA

Bei der Isolation von RNA wurden nur RNase-freie Gefäße genutzt. Die verwendeten Reagenzien wurden mit Spitzenvorsatzfiltern mit 0,22 µm Porengröße (Roth, Karlsruhe) sterilfiltriert.

Zur RNA-Isolation aus *P. endiviifolia* wurden 100mg Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert. Nach Zugabe von 1 ml TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) wurde weitergemörser und die Emulsion in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation zur Entfernung grober Zellbestandteile (12000 x g / 10 min / 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die RNA-Isolation aus dem Dinoflagellaten *A. carterae* wurden 50 ml Kultur abzentrifugiert (2500 x g / 10 min / 4°C) und nach Resuspension in 1 ml Medium in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Erneut wurde die Kultur abzentrifugiert (2500 x g / 1 min / 4 °C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml TRIZOL resuspendiert. Die Probe wurde anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Hinzufügen von 200 µl Chloroform wurde gut geschüttelt und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g / 15 min / RT) wurde die obere, wässrige

Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol gemischt. Zur Fällung erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation (12000 x g / 10 min / 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 – 50 µl H₂O_{bidest/filtriert} gelöst.

7.2.1.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

7.2.1.3.1 Phenol-Extraktion

Eine Phenol-Extraktion wurde zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäure-haltigen Lösungen angewendet. Zu der nukleinsäure-haltigen Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis von 24/24/1) gegeben und kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (12000 x g / 10 min / 15 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Phenol-Extraktionsschritt wiederholt. Um verbliebenes Phenol aus der nukleinsäure-haltigen Lösung zu entfernen wurde anschließend eine Chloroform-Extraktion (3.2.3.2) durchgeführt.

7.2.1.3.2 Chloroform-Extraktion

Eine Chloroform-Extraktion wurde bei der Isolation von Nukleinsäuren und nach vorheriger Phenol-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24/1) zu der wässrigen Lösung gegeben und sehr gut geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (12000 x g / 10 min / 15 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend konnten die Nukleinsäuren direkt gefällt werden oder bei Bedarf eine erneute Chloroform-Extraktion durchgeführt werden.

7.2.1.3.3 Fällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren aus wässriger Lösung anzureichern wurde eine Natriumacetatfällung durchgeführt. Hierzu wurde zum vorliegenden Lösungsvolumen das 0,1fache Volumen 3M Natriumacetat und 2,5fache Volumen Ethanol_{absolut} hinzugegeben. Nach Zentrifugation (20000 x g / 30 min / 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Nukleinsäurepellet mit 70% Ethanol gewaschen (20000 x g / 10 min / 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet und in 20 – 40 µl H₂O_{bidest} gelöst.

7.2.1.4 cDNA Synthese

7.2.1.4.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit DNase I

Obwohl die verwendete RNA-Isolationsmethode mit TRIZOL® speziell zur Isolation von RNA abgestimmt ist, kann davon ausgegangen werden, dass in der Lösung noch DNA vorliegt. Um DNA Kontamination vor der cDNA Synthese auszuschließen, wurde die isolierte RNA zunächst mit DNase I

behandelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNase I von Roche (Mannheim) und Fermentas (St. Leon Roth) verwendet.

Für die DNase I von Roche (Mannheim) wurde ein 200 µl Ansatz verwendet. Dazu wurden 4 – 6 µg der mit TRIZOL® isolierten RNA mit H₂O_{bideist/filtriert} auf ein Volumen von 175 µl aufgefüllt und mit 20 µl 10x DNase I – Puffer gemischt. Nach Zugabe von 5 µl DNase I wurde bei 37 °C für 1 – 1 1/2 Stunden inkubiert.

10x DNase I Puffer	400 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM MgCl ₂

Mit der DNase I von Fermentas (St. Leon Roth) wurde ein 20 µl Ansatz gewählt. 2 – 4 µg mit TRIZOL® isolierte RNA wurden mit H₂O_{bideist/filtriert} auf ein Volumen von 16 µl aufgefüllt und mit je 2 µl 10x Puffer und DNase I gemischt. Nach der Inkubation für 1 - 1 1/2 Stunden bei 37 °C wurde mit H₂O_{bideist/filtriert} auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt.

Nach beiden DNase I Behandlungen wurde, um DNase aus der Lösung zu entfernen, jeweils eine 2fache Phenol-Extraktion und anschließende 1fache Chloroform-Extraktion (3.2.3) durchgeführt. Die RNA wurde mittels Natriumacetat-Ethanol-Fällung (Punkt 7.2.1.3.3) aus der Lösung gefällt und in 20 µl H₂O_{bideist/filtriert} aufgenommen. Um diese RNA auf eventuell noch vorhandene DNA zu überprüfen, wurde 1 µl der DNase behandelten RNA in eine PCR mit positiv und negativ Kontrolle eingesetzt.

7.2.1.4.2 Reverse Transkription

Zur cDNA Synthese über Reverse Transkription mit der M-MuLV Reversen Transkriptase (Fermentas, St. Leon Roth) wurden 1 – 5 µg DNase I behandelte RNA (7.2.1.4.1) eingesetzt. Nach Zugabe von Hexaoligonukleotiden (10 pmol) wurde mit H₂O_{bideist/filtriert} auf ein Volumen von 24 µl aufgefüllt und zur Denaturierung für fünf Minuten bei 60 °C inkubiert. Wieder auf Eis wurden 8 µl 5x Reaktionspuffer, 4 µl dNTPs (10 mM) und 4 µl Reverse Transkriptase (20 U/µl) hinzugefügt und kurz gemischt. Nach zehnmündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch Inkubation für 10 Minuten bei 70 °C beendet.

Reaktionsansatz 40 µl	1 – 5 µg RNA, DNase I behandelt
	1 µl Zufallshexaoligonukleotide (10 pmol)
	ad 24 µl H ₂ O _{bideist/filtriert}
	8 µl 5 x Reaktionpuffer
	4 µl dNTPs (10 mM je dNTP)
	4 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)

Neben der M-MuLV Reversen Transkriptase wurde auch die Omniscript Reverse Transkriptase von Qiagen (Hilden) verwendet. Es wurde ein 40 µl Ansatz verwendet. Zu 1 – 5 µg DNase I behandelte RNA (7.2.1.4.1) wurden 1 µl Zufallshexaoligonukleotide gegeben und für fünf Minuten bei 60 °C denaturiert. Es folgte die Zugabe von 4 µl 10 x Reaktionspuffer, 4 µl dNTPs (5mM), 2 µl Reverse Transkriptase (4U/µl), mit H₂O_{bideist/filtriert} wurde der Ansatz auf 40 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Anschließend folgte eine Inkubation für 1 – 1 1/2 Stunden bei 37 °C und die Reverse Transkriptase wurde durch Inkubation bei 93 °C für fünf Minuten denaturiert.

Reaktionsansatz 40 µl	1 – 5 µg RNA, DNase I behandelt
	1 µl Zufallshexaoligonukleotide (10 pmol)
	4 µl 10 x Reaktionspuffer
	4 µl dNTPs (5 mM je dNTP)
	2 µl Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/µl)
	ad 40 µl H ₂ O bidest/filtriert

Alternativ zu der Gesamt-cDNA Synthese mit Zufallshexaoligonukleotiden wurde das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Hierbei wird mit genspezifischen Primern gearbeitet. Durch den Enzymmix mit Reverser Transkriptase und *Taq*-Polymerase kann ein spezifisches Gen von der RNA Ebene aus zunächst revers transkribiert und anschließend amplifiziert werden. Die Reaktion erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Je Reaktion wurden 2 µl DNase I behandelte RNA eingesetzt.

7.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um spezifische Bereiche von DNA und cDNA zu amplifizieren wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Für Fragmente bis zu einer Größe von ca. 2 kb wurde standardmäßig die *Taq*-Polymerase der Firma Biotools (Madrid, Spanien) verwendet.

PCR-Reaktionsansatz (50 µl)	5 µl Reaktionspuffer	1 x
	4 µl MgCl ₂ (25 mM)	1 - 5 mM
	2 µl dNTPs (10 mM je dNTP)	0,4 mM
	je 1 µl Primer (10 pmol/µl)	0,2 µM
	DNA / cDNA	50 – 500 ng
	0,5 µl <i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/µl)	0,05 U/µl
	ad 50 µl H ₂ O	

Die Mg²⁺-Konzentration wurde teils variiert. Standardmäßig wurde jedoch eine 4,5 mM Magnesiumchloridkonzentration verwendet. Die Amplifikation erfolgte in Thermocyclern (*gradient/personal*) der Firma Eppendorf (Hamburg). Die Annealingtemperatur für die Primer wurde meist, je nach Primerpaar, im Bereich von 48 – 55 °C eingestellt. Ebenso wurde die Elongationszeit der Amplifikatlänge, unter Annahme von 1 ^{min}/kb, angepasst.

PCR – Programm

Initial	Denaturierung	3 min	96 °C
29 Zyklen á	Denaturierung	30 sec	96 °C
	Annealing	20 sec	48 – 55 °C
	Elongation	30 sec – 1 min 30 sec	72 °C
Terminal	finale Elongation	2 min	72 °C
	Abkühlung	10 sec	25 °C

Für längere (1,5 – 3 kb) und schwierig zu amplifizierende Fragmente wurde die Phusion-Polymerase der Firma Finnzymes (Espoo, Finnland) verwendet. Hier wurden dem Reaktionsansatz 1 µl dNTPs (10 mM) und 2 µl MgCl₂ (25 mM) zugesetzt. Weiterhin konnte die Elongationszeit (15 – 30 ^{sec} / 1 kb) verkürzt werden.

PCR-Reaktionsansatz (50µl)	5 µl Reaktionspuffer (Phusion-Polymerase)	1 x
	2 µl MgCl ₂ (25mM)	2,5 mM
	2 µl dNTPs (10mM je dNTP)	0,2 mM
	je 1 µl Primer (10pmol/µl)	0,2 µM
	DNA / cDNA	50 – 500 ng
	0,5 µl Phusion Polymerase (5U/µl)	0,05 U/µl
	ad 50 µl H ₂ O	

Das PCR Programm wurde nach Herstellerangaben eingestellt.

7.2.1.6 Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte, je nach erwarteter Länge, auf 0,8 – 2%igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Gele wurde 1 x TBE-Puffer verwendet und zur Visualisierung unter UV wurde den Gelen das interkalierende Reagenz Ethidiumbromid (3,75^{µg}/ml) oder Roti-Safe (5µl/150ml) zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10 x Ladepuffer versetzt. Als Längenstandard diente die GeneRuler Express DNA Ladder von Fermentas (St. Leon-Roth).

10 x TBE Puffer	10 x Ladepuffer
1 M Tris / HCl, pH 8.8	4 M Harnstoff
0,83 M Borsäure	50 % (w/v) Saccharose
10 mM Na ₂ EDTA	50 mM EDTA
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	0,1 % (w/v) Xylencyanol

7.2.1.7 Aufreinigung von PCR – Amplifikaten

Zumeist wurden die PCR – Produkte direkt aus dem PCR Ansatz für die Sequenzierung aufgereinigt. Dazu wurde nach Herstellerangaben das NucleoSpin Extract II Kit von Machery Nagel (Düren) verwendet.

Wurden auf einem Agarosegel mehrere Banden, durch z.B. Introns, beobachtet, erfolgte eine Extraktion aus dem Agarosegel. Dafür wurden ca. 15 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen und entsprechende Banden ausgeschnitten. Für Extraktionen von Produkten aus der Gelmatrix wurde, ebenfalls nach Herstellerangaben, das JetSorb System genutzt.

7.2.2 Klonierung

7.2.2.1 Herstellung RbCl₂-kompetenter Zellen

Zum Klonieren wurden chemokompetente *Escherichia coli* Top10 verwendet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde die RbCl₂-Methode genutzt. Dazu wurde eine Einzelkolonie Top10-Zellen in einer 2ml Übernachtskultur in LB-Medium angezogen. Am darauf folgenden Tag wurden mit der

Übernachtskultur 100 ml LB-Medium angeimpft und im Medium eine 10mM Endkonzentration von MgCl_2 und MgSO_4 eingestellt. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,6$ bei 200 rpm geschüttelt. In 50 ml Falcon-Tubes wurden die Zellen für 15 – 30 Minuten auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend abzentrifugiert ($3000 \times g / 10 \text{ min} / 4 \text{ °C}$). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 33 ml RF1 mit der Glaspipette resuspendiert. Nach weiteren 15 – 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert ($3000 \times g / 10 \text{ min} / 4 \text{ °C}$) und die Zellen, nach Abnahme des Überstandes, in 5 ml RF2 resuspendiert. In 15 ml Falcon-Tubes wurden die Zellen erneut 15 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zu 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C. Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden auf Eis und im 4 °C Kühlraum durchgeführt.

RF1	RF2
100 mM RbCl_2	10 mM MOPS
50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	10 mM RbCl_2
30 mM KAc	75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	15 % (w/v) Glycerin
15 % (w/v) Glycerin	
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, dann steril filtriert	pH 5,8 mit NaOH eingestellt, dann steril filtriert

7.2.2.2 Ligation und Transformation

Die PCR-Produkte wurden in den pJet1.2/blunt Cloning Vektor der Firma Fermentas (St. Leon Roth) kloniert. Produkte aus Amplifizierung über *Taq*-Polymerase wurden zunächst nach Herstellerangaben mit dem im Kit enthaltenen *‘Blunting enzyme’* behandelt.

Die Ligation in Transfektionsvektoren erfolgte nach Aufreinigung der mit spezifischen Restriktionsenzymen behandelten DNA-Fragmente mit der T4 DNA Ligase der Firma Fermentas (St. Leon Roth). Zur Ligation wurden die zu klonierenden DNA-Fragmente in einem mindestens dreifach höheren molaren Verhältnis im Vergleich zum Vektor eingesetzt.

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation wurden 100 µl Aliquots chemokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zu dem Ligationsansatz wurden 50 µl der kompetenten Zellen direkt hinzugegeben und der Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach einer Minute auf Eis wurden vorgewärmte 250 µl LB-Medium hinzugegeben und das Eppendorfgefäß für 30 Minuten schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert ($3000 \times g / 3 \text{ min} / 4 \text{ °C}$) und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die wieder aufgenommenen Zellen wurden dann auf LB-Ampicillin Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten konnten am darauf folgenden Tag Einzelkolonien zur Animpfung von Übernachtskulturen verwendet werden.

7.2.2.3 Plasmidisolation

Die Plasmidpräparation erfolgte mittels alkalischer Lyse nach einem modifizierten Protokoll nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert ($15000 \times g / 1 \text{ min} / 4 \text{ °C}$) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 150 µl Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 gut gemischt. Das

Gemisch wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 200 µl Puffer P3 und 30 µl Chloroform hinzugegeben. Es wurde gut gemischt und für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 x g / 20 min / 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (20000 x g / 20 min / 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen (20000 x g / 10 min / 4 °C), getrocknet und in 40 µl H₂O_{bidest} gelöst.

Puffer P1
50 mM Tris / HCl pH8
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A (zugeben nach autoklavieren)

Puffer P2
200 mM NaOH
1% (w/v) SDS (zugeben nach autoklavieren)

Puffer P3
3 M Kaliumacetat (pH 5,5, mit Essigsäure einstellen)

Vor einer möglichen Sequenzierung wurde für die isolierten Plasmide je eine Insertkontrolle über eine Restriktion durchgeführt.

Restriktionsansatz	1 µl Plasmidisolation	10 x SDB Puffer	0,3 M Tris/HAc pH 7,0
	0,5 µl 10 x SDB Puffer		0,5 M KAc
	3,3 µl H ₂ O _{bidest}		0,1 M MgAc ₂
	0,1 µl Restriktionsenzym Xho I		49 mM Spermidin
	0,1 µl Restriktionsenzym Xba I		50 mM DTT

Der Restriktionsansatz wurde für $\frac{1}{2}$ – $1\frac{1}{2}$ Stunden bei 37 °C inkubiert und auf einem Agarosegel (7.2.1.6) analysiert. Plasmide mit Insert wurden sequenziert.

7.2.3 Isolation von *minicircles* und Transposonmutagenese

Die Isolation von *minicircles* erfolgte auf dichte 50ml *A. carterae* Kultur gemäß dem Plasmidisolutionsprotokoll für *E. coli* (Punkt 7.2.2.3).

Das Transposon wurde mittels PCR vom Vektor EZ-Tn5TM <R6K γ ori/KAN-2> (Epicentre, Madison, USA) direkt mit den Primern PCRFP und PCRRP amplifiziert und anschließend mit dem Fermentas *Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Molarität wurde nach folgender Formel (Epicentre, Herstellerangabe) für *minicircle* (ca. 2800bp) und Transposon berechnet:

$$\text{___ } \mu\text{g}/(\text{Anzahl bp} \times 660) = \text{___ } \mu\text{mol}$$

Minicircle und Transposon wurden in Verhältnissen von 1:1 – 20:1 eingesetzt. Die Transposasereaktion (EZ-Tn5TM Transposase, Epicentre, Madison, USA) erfolgte dann in einem 10µl Ansatz nach Herstellerangaben. Die Reaktion wurde jedoch nicht mit der Stop-Lösung beendet. Stattdessen wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt (s.o. 7.2.1.3.1/.2) und das Pellet in 5µl ddH₂O aufgenommen.

Der komplette Ansatz wurde zur Transformation von 50µl TransfoMaxTM EC100DTM *pir*-116 elektrokompenten Zellen verwendet. Die Transformation erfolgte im GenePulser Elektroporator (BioRad, München) nach Herstellerangaben.

Der Ansatz wurde anschließend auf Agarplatten mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle der Übernachtskulturen erfolgte mittels Restriktionskontrolle mit PstI.

7.2.4 Midi-Plasmidisolation für die Transfektion von *Phaeodactylum tricornutum*

Die Isolation von Plasmiden erfolgte aus einer 50ml *E. coli* Übernachtskultur mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben. Das final Pellet wurde in $100\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und die Konzentration mit dem NanoDrop bestimmt.

7.2.5 Midi-Plasmidisolation für die Transfektion von Protoplasten

Eine 50ml *E. coli* Übernachtskultur wurde abzentrifugiert ($5000 \times g$ / 15min / 4°C), der Überstand vollständig abgenommen und in 3ml Lysepuffer (entspricht Puffer P1, Punkt 7.2.2.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 7ml NaOH/SDS-Lösung wurde vorsichtig gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3,5ml kalte, frisch aufgeschüttelte Sambrooks KAc-Lösung hinzugegeben und für 20min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert ($5000 \times g$ / 20min / 4°C) und durch einen Trichter mit Watte filtriert. Das Filtrat wurde mit 7ml Isopropanol versetzt, gevortext und 1h auf -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation ($11000 \times g$ / 20min / 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet getrocknet und anschließend in $500\mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen. Das Volumen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, $500\mu\text{l}$ LiCl-Puffer zugegeben, gevortext und für 30min – 1h auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation ($6000 \times g$ / 10min / 4°C) in eine neues Gefäß überführt (15ml Falcon) und mit 0.1 x Volumen 3M NaAC (ph 5,2) und 2.5 x Volumen reinen Ethanol (kalt) versetzt, gevortext und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation ($11000 \times g$ / 20min / 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet, in $300\mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden $10\mu\text{l}$ RNase A und RNase T1 (jeweils 500U / ml) hinzugefügt, gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde $15\mu\text{l}$ Proteinase K hinzugefügt, erneut gemischt und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Phenol-/Chloroformextraktion (Punkt 7.2.1.3) durchgeführt (hier ein Volumen von $330\mu\text{l}$). Der letzte Überstand wird erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 0.1 x Volumen 3M NaAC (ph 5,2) und 2.5 x Volumen reinen Ethanol (kalt) versetzt und $\geq 1\text{h}$ auf -20°C inkubiert. Nach Inkubation wurde zentrifugiert ($20000 \times g$ / 20min / 4°C) und das Pellet mit $350\mu\text{l}$ 70%igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet, in $100\mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen und für 30min schüttelnd im ThermoMixer inkubiert. Nach Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop wurde die Konzentration auf ca. $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung	200mM 1% (w/v)	NaOH SDS	TE-Puffer(pH 7,5)	10mM 1mM	Tris/HCl pH 7,5 EDTA pH 8
Sambrooks KAc-Lösung	3M 11,5% (v/v)	KAc Eisessig	LiCl-Puffer	5M 50mM (mit NaOH auf pH 8 einstellen)	LiCl MOPS

7.2.6 Sequenzierungen

Alle Sequenzen wurden mit dem Sequenziergerät ‚ABI PRISM 377 DNA Sequencer‘ (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Die zu Grunde liegende Sequenziermethode beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierreaktion wurde der ‚DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit‘ (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Zunächst wurden die PCR Produkte wie oben beschrieben (7.2.1.7) aufgereinigt. Anschließend erfolgte die ungefähre Konzentrationsbestimmung über die Gelelektrophorese. Für die Sequenzierreaktion wurden ca. 10^{ng}/kb Template eingesetzt. Aus Plasmidpräparationen wurden standardmäßig 3-4 µl (1 – 2 µg) eingesetzt. Im Weiteren setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

Sequenzieransatz (10 µl)	10 ng/kb Template DNA
	0,5 µl Primer (10 pmol/µl)
	2 µl DYEnamic Sequenziermix
	ad 10 µl H ₂ O _{bidest}

Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler unter Verwendung folgender Temperaturzyklen:

Programm für Sequenzierreaktion

Initial	Denaturierung	3 min	95 °C
29 Zyklen á	Denaturierung	20 sec	95 °C
	Annealing	20 sec	48 – 55 °C
	Elongation	2 min	60 °C
	Abkühlung	10 sec	25 °C
Terminal			

Auch hier wurde die Annealingtemperatur dem jeweils verwendeten Primern angepasst. Um verbliebene, nicht eingebaute, Terminatoren aus der Reaktionslösung zu entfernen, wurde dem Reaktionsansatz 26 µl H₂O_{bidest} und 64 µl 100% Ethanol_{unvergällt} zugegeben und unter Lichtausschluss für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 x g / 20 min / 4 °C) wurde das Pellet mit 190 µl 70% Ethanol gewaschen (20000 x g / 10 min / 4 °C) und unter Lichtausschluss getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 3 µl ‚Formamide Loading Dye‘ (GE Healthcare, Freiburg) aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

Die Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte über 11 Stunden auf einem 0,2 mm dicken und 48 cm langen 6,3 %igen Polyacrylamidgel im ABI Sequenziergerät.

10 x TBE _{ABI}	0,89 M Tris
	0,89 M Borsäure
	20 mM EDTA

Sequenziergel	18 g Harnstoff
	22,8 ml H ₂ O _{bidest}
	5,33 ml Acrylamidlösung 40 % (29:1)
	6 ml 10 x TBE _{ABI} -Puffer

Lösung filtrieren und entgasen, dann Zugabe von	
	300 µl APS (10 %)
	20 µl TEMED

7.2.7 Sequenzauswertung

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm Sequencher. Zur Identifikation der Leseraster des Plastidengenoms wurde der ORF Finder und die BLAST-Anwendung (*Basic Local Alignment Search Tool*) von NCBI verwendet. Um tRNAs zu identifizieren, wurde die Internetanwendung *tRNAscan SE* verwendet.

7.2.8 Transfektion

7.2.8.1 Isolation und Transfektion von *Arabidopsis thaliana* Mesophyll Protoplasten

Mesophyll Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden wie in Sommer *et al.*, 2011 (Sommer *et al.*, 2011) beschrieben isoliert und transfiziert. Dazu wurde die Unterseite der Blätter von 4-6 Wochen alten Pflanzen leicht über Sandpapier (P180) gerieben und zunächst mit der Unterseite auf einer Lösung mit 10ml MCP, 10ml H₂O und 200µl BSA-Lösung gelegt und gewaschen. Die Waschlösung wurde entfernt und die Plasmolyse erfolgte für ca. 3h bei 30°C auf 20ml Enzymlösung. Freie Protoplasten wurden anschließend durch ein 72 µm Nylonnetz filtriert und mit 100% Percolllösung unterlegt. Nach Zentrifugation (405 x g, 8min, RT, ohne Bremse) wurden ca. 20 ml klarer Überstand entfernt und die Protoplasten mit der verbliebenen Lösung leicht schüttelnd vermengt (dadurch sollte eine ca. 40%ige Percolllösung entstehen. Diese Lösung wurde mit 7,5ml 25%iger Percolllösung und 5 ml MCP-Lösung überlegt um einen dreistufigen Gradienten zu erhalten. Nach erneuter Zentrifugation (270 x g, 8 min, RT, ohne Bremse) wurden die intakten Protoplasten aus der grünen Bande zwischen MCP und 25% Percoll abgenommen (ca. 10ml). Das abgenommene Volumen wurde 1:1 mit MCP gemischt und die Protoplasten abzentrifugiert (100 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten mit MMg auf eine Zellnummer von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Transfektion wurden 100 µl Protoplasten, 10 µg Plasmid-DNA und 100 µl PEG-Ca-Lösung gemischt und für 20min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1ml K3-Lösung gestoppt und die Protoplasten unter konstantem Licht bei 20°C über Nacht inkubiert. Die Analyse unter dem KLSM erfolgte 10-14h nach der Transfektion.

MCP	29 mM 500 mM 1 mM	MES/KOH, pH 5.6-6.0 Sorbitol CaCl ₂	BSA-Lösung	10 % (w/v)	BSA
Enzymlösung*		1% (w/v) 0,3% (w/v)	Cellulase (SERVA, Heidelberg) Macerozyme (SERVA, Heidelberg)		
100%ige Percolllösung*		5mM 500mM 100% (v/v) 1 mM (alles direkt in 100% Percoll lösen)	MES (pH-Wert nicht einstellen) Sorbitol Percoll CaCl ₂		
25%ige Percolllösung*		25% (v/v)	100%ige Percolllösung in MCP		

MMg	5 mM	MES/KOH, pH 5.6-6.0	K3	20 mM	MES/KOH, pH 5.6-6.0
	400 mM	Sorbitol		400 mM	Sorbitol
	15 mM	MgCl ₂		1 mM	CaCl ₂
				1x	Musharige-Skoog-Salze und Vitamine (Sigma, Steinheim)
PEG-Ca*		100mM	CaCl ₂ , pH 8.0		
		400mM	Sorbitol		
		40% (w/v)	PEG-4000		

*Lösung wurde vor jeder Benutzung frisch ansetzen.

7.2.8.2 Transfektion von *Phaeodactylum tricornutum*

Die biolistische Transfektion von *P. tricornutum* wurde nach dem Protokoll von Apt (Apt *et al.*, 1996) durchgeführt. Als Selektionsmarker diente Zeozin mit einer Endkonzentration von 75 µg/ml.

Bereits vor der Transfektion wurden die Mikrocarrier vorbereitet. Dazu wurden 60 mg M 10 (Ø 0.7 µM) Wolfram-Partikel (Bio-Rad, München) mit 1 ml 100 % EtOH (HPLC Qualität) gewaschen, 5 min gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Die Mikrocarrier wurden dann in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und zu 50 µl Aliquots aufgeteilt. So wurden die Carrier bei -20°C gelagert.

Am Tag der Transformation wurde eine ca. eine Woche alte *P. tricornutum*-Kultur geerntet und pro zu transfizierendes Konstrukt mit f/2-Medium auf eine Zellzahl von 3x 10⁸ Zellen/ml eingestellt. Dazu wurde zuvor mit einer Thoma-Zählkammer die Zellzahl der Kultur ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \varnothing \cdot 4 \cdot 10^6;$$

Ø: durchschnittliche Zellzahl aus fünf ausgezählten Kleinquadraten

Für jedes Transformationskonstrukt wurden drei f/2-Agarplatten ohne Zeozin vorbereitet, auf die mittig 100 µl mit je 10⁸ Zellen ausplattiert wurden.

Zur Beladung der Mikrocarrier mit dem zu transformierenden Plasmid wurden 50 µl vorbereitete Mikrocarrier, 5-10 µg des Transformationskonstrukts, 50 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) zusammenpipettiert. Nach 1 min vortexten bei RT wurde der Ansatz zur Sedimentation der Mikrocarrier für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Partikel in 250 µl 100 % EtOH (HPLC-Qualität) gewaschen. Nach erneuter Sedimentation und Abnehmen des Überstands wurden die Mikrocarrier mit gebundener DNA in 50 µl 100 % EtOH (HPLC-Qualität) aufgenommen. Die Transfektion wurde direkt im Anschluss gestartet, da die DNA innerhalb einer Stunde verbraucht werden sollte.

Die biolistische Transfektion wurde mit dem *Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System* durchgeführt. Zuerst wurde ein Reinigungsschuss durchgeführt und anschließend alle Komponenten gründlich mit 100 % EtOH (HPLC-Qualität) gereinigt. Danach wurde mit der Transfektion begonnen. Pro Transfektionskonstrukt wurden drei Transfektionsschüsse durchgeführt.

Dazu wurden 15 µl der Mikrocarrier-DNA-Suspension auf eine Mikrocarriermembran (Bio-Rad, München) aufgetragen und das System nach Herstellerangaben zusammengebaut. Dabei wurde die

Metallplatte mit der Mikrocarriermembran in Position 1 installiert und die f/2-Agarplatte mit den Zellen in Position 2 verankert. Die Transfektion fand im Vakuum bei -25 psi statt und auf die Rapture Disc (1350) (Bio-Rad, München) wurde ein Druck von 1350 psi ausgeübt. Sobald sich der Schuss gelöst hat, wurde das Vakuum in der Kammer wieder abgebaut.

Die Agarplatten mit den Zellen wurden mit Parafilm verschlossen und für 24 h im Dauerlicht (8000 - 11000 Lux) bei 22 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen am Tag nach der Transfektion mit 1 ml f/2-Medium abgeschwemmt und zu gleichen Teilen auf drei Zeozin-haltige f/2-Agarplatten ausplattiert. Mit Parafilm versiegelt wurden die Platten für ca. 2 Wochen inkubiert bis sich die ersten Kolonien zeigten.

Diese Transformanten wurden für weitere Versuche auf frische f/2-Agarplatten mit Zeozin überimpft.

7.2.9 Proteinanalytik

7.2.9.1 Lyse von *Amphidinium carterae*

Die Lyse von *A. carterae* erfolgte entweder mit der FrenchPress oder der Zelmühle. Die eingesetzte Menge an Kultur wurde je nach Anwendung variiert.

Für die Lyse mit der FrenchPress wurden *A. carterae* sedimentiert (1500 x g / 10min / RT) und dreimal mit frischem f/2-Medium gewaschen (500 x g / 10min / 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 3ml SolubilisierungspufferA (SolA) aufgenommen. Dem Puffer wurde zuvor PIC (1:200) zugesetzt. Die eigentliche Lyse erfolgte dann mit 3-4 Durchgängen an der FrenchPress bei 1000 psi (20.000 psi in der Zelle)

Für die Lyse mit der Zelmühle wurden *A. carterae* Zellen wie oben beschrieben zunächst geerntet und gewaschen. Hier wurden die Zellen nun in 1ml SolA (mit PIC 1:200) aufgenommen und erneut zentrifugiert (500 x g / 10min / 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Zellpellet in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Eppendorfgefäß wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und eine Mahlkugel (Edelstahl) wurde in das Gefäß gegeben. Nach erneutem Eintauchen in Stickstoff wurde das Pellet in der Zelmühle 2 min 30 sec bei 30 Hz gemahlen. Danach wurde das Eppendorfgefäß wieder zügig in den flüssigen Stickstoff gegeben, die Mahlkugel in eine Petrischale überführt und der vorherige Überstand wieder auf die behandelten Zellen gegeben. Noch intakte Zellen wurden abzentrifugiert (500 x g / 10min / 4°C) und wieder für die Behandlung in der Zelmühle vorbereitet. Insgesamt wurde erfolgte die Lyse in fünf Durchgängen.

Solubilisierungspuffer A		Proteinase Inhibitor Cocktail (PIC)	
Imidazol/HCl pH 7,5	50mM	Antipain	2 mg/ml
NaCl	50mM	Chymostatin	5 mg/ml
6-Amino-Capronsäure	2mM	Aprotinin	2mg/ml
EDTA	1mM	Trypsin-Inhibitor	5mg/ml
		NaEDTA	2mg/ml
		Pepstatin	2mg/ml
		Leupeptin	5mg/ml
		Elastatinal	1mg/ml

7.2.9.5 Fraktionierung von Proteinextrakten mittels Carbonatextraktion

kurz vor der Verwendung wurde PIC (1:200) zugesetzt

104

Anhand einer mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellten Eichgerade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

$$OD_{615} = m \cdot \text{Proteinmasse}_{(\mu\text{g})}$$

(m = Steigung der Eichgeraden)

Amidoschwarz-Färbelösung
 Essigsäure 10 % (v/v)
 Methanol 90 % (v/v)
 Amidoschwarz Spatelspitze

Amidoschwarz-Waschlösung
 Essigsäure 10 % (v/v)
 Methanol 90 % (v/v)

7.2.9.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) wurden Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (20000 x g / 5 min / 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 12,5%-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung in SDS-Laufpuffer erfolgte bei 32mA mit maximal 170 V.

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel:

	Trenngel	Sammelgel
Konzentration an PAA	12,5 %	5 %
30% (v/v) PAA	4,1 ml	0,9 ml
ddH ₂ O	3,2 ml	2,9 ml
Trenngelpuffer 4x	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer 4x	-	1,2 ml
TEMED	20 µl	15 µl
10 % (w/v) APS	150 µl	85 µl

Trenngelpuffer (4x)
 Tris/HCl (pH 8.8) 1,5 M
 SDS 0,4 % (w/v)

Sammelgelpuffer (4x)
 Tris/HCl (pH 6.8) 500 mM
 SDS 0,4 % (w/v)

SDS-Laufpuffer (10x)	SDS	1% (w/v)
Tris	250 mM	
Glycin	2 M	

7.2.9.8 Transfer von Proteinen auf Membranen und Immundetektion (WesternBlot)

Zum Transfer und Immobilisierung von Proteinen wurde ein WesternBlot nach Towbin (Towbin *et al.*, 1979) (kontinuierliches System) durchgeführt. Dabei werden Proteine von einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe oben) unter Anlegung eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Die Detektion eines bestimmten Proteins kann anschließend mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit dem TE 77 *Semy-Dry Transfer System* für 1h bei 0,8mA/cm² und bis zu 50 V. Die Membranen wurden für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Zum Blotten wurden zuunterst drei Whatman-Papiere gelegt, darauf die Membran und das PAA-Gel geschichtet und zum Schluss nochmals drei Whatman-Papiere aufgelegt. Für die Immundetektion mit einem Antikörper musste die Membran zunächst für 1h in Blockingreagenz auf dem Rollschüttler inkubiert werden, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper (siehe 7.1.11) in Blockingreagenz rollend und bei RT für 1h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für mindestens je 10min in 1x TBS-T gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Kapitel 5.1.9) ebenfalls in Blockingreagenz für 1 h rollend bei RT. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für mindestens je 10 min mit 1x TBS - T gewaschen, zuletzt 10 min mit 1x TBS.

Nun konnte die Detektion mit der ECL-Lösung erfolgen. An den Sekundärantikörper ist das Enzym *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt, welches bei der Zugabe der Lösung ein Substratmolekül umsetzt. Dabei wird elektromagnetische Strahlung emittiert, die mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde.

Transferpuffer		Blockingreagenz	
Tris/HCl (pH 8.4)	25 mM	Magermilchpulver	5 % (w/v) in 1x TBS-T
Glycin	192 mM		
Methanol	20 % (v/v)		
KCl	2,7 mM		
NaCl	140 mM		
1x TBS		ECL-Lösung	
Tris/HCl (pH 7.5)	100 mM	Luminol in DMSO	5 mM
NaCl	150 mM	Coomaric Acid in DMSO	0.8 mM
		Tris/HCl pH 8.5	200 mM
1x TBS-T		Kurz vor Gebrauch wurden 30% H ₂ O ₂ im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.	
1x TBS + Tween 20	0,05 % (w/v)		

7.2.9.9 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet. Die Färbelösung wurde mit 70 mg des Farbstoffs und einer Konzentration von 35mM HCl in 1L ddH₂O angesetzt.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dreimal für 30 s in ddH₂O erhitzt und 2-5 min inkubiert, dabei aber nicht gekocht. Anschließend wurde das Gel in der Färbelösung für 30sec erhitzt und je nach gewünschter Färbung bis zu 15 min schüttelnd inkubiert. Das Entfärben des Hintergrunds wurde schüttelnd in ddH₂O vorgenommen.

7.2.10 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie am Leica TCS SP2 wurde die Analyse der transformierten *P. tricornutum*-Klone und der transient transformierten Protoplasten durchgeführt. Als Objektiv diente das APO 40x/1.25-0.75 Öl CS. GFP- und Chlorophyllfluoreszenz wurden mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt, mit dem Teilerspiegel 488/543/633 gefiltert und durch zwei Photomultiplier detektiert (GFP: 500-525 nm; Chlorophyll: 600-680 nm). Die Bildanalyse erfolgte mit der Software LCS Lite von Leica (Wetzlar).

7.2.11 Elektronenmikroskopie

Um einen möglichen inhibitorischen Effekt auf den plastidären Proteinimport elektronenmikroskopisch zu untersuchen, wurden *A. carterae* Zellen ab eine Stunde vor einsetzen des Lichts für insgesamt fünf Stunden mit 2,5^{µg}/ml Brefeldin A behandelt.

7.2.11.1 Gefriersubstitution

Die mit Brefeldin A behandelten Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (1000 x g / 10 min / 20°C) und zur Gefriersubstitution in flüssigem Propanol gefroren. Bis zur Substitution wurden die Zellen dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden dann bei -90°C in 0,5% Glutaraldehyd (EM Qualität, mit 100% Azeton verdünnt) für fixiert. Anschließend wurde die Temperatur schrittweise für je acht Stunden über -60°C und -30°C bis auf 0°C erhöht. Um die Zellen vollständig und schrittweise einzubetten wurden die Proben auf Eis in Schritten von je zwei Stunden in LR-White-Azeton Verdünnungen von 1:2, 1:1 und 2:1 imprägniert. Die Polymerisation von unverdünntem LR White erfolgte dann für 48 Stunden unter UV-Licht.

Von den LR-White Blöcken mit den Brefeldin A behandelten und gefriersubstituierten Zellen wurden dann Ultradünnschnitte mittels eines Diamantmessers (Dupont, Uentrop) an einem Mikrotom (Leica, Wetzlar) hergestellt.

Die Ultradünnschnitte wurden dann auf Nickelnetze „gefischt“ und es erfolgte die Immunogoldmarkierung oder, für eine direkte Betrachtung unter dem EM, eine Nachkontrastierung. Dazu wurden die Netze erst 5 min in 2%iger Uranyl-Azetat Lösung und anschließend, ebenfalls für 5 min, in Bleicitrat (Merck, Darmstadt) inkubiert (Reynolds, 1963).

Als Vergleich wurde eine unbehandelte Kultur zum selben Zeitpunkt geerntet und ebenso behandelt.

7.2.11.2 Immunogold-Markierung

Für die subzelluläre Lokalisierung der untersuchten Proteine wurden die Ultradünnschnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern und sekundär Antikörpern, an 30nm Goldpartikel gekoppelt, behandelt. Dazu wurden die Ultradünnschnitte auf ein Nickelnetz ‚gefischt‘ und für 15 min in 1% BSA in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für vier Stunden mit dem Primärantikörper, jeweils in den angegebenen Verdünnungen (in PBS). Nachdem dreimal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Gold-gekoppelten (30nm) Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:140 für 45 min. Erneut wurden die Schnitte dreimal mit PBS und zusätzlich einmal mit ddH₂O gewaschen und daraufhin, wie oben beschrieben, nachkontrastiert. Die Lagerung erfolgte in Grid-Boxen.

7.2.12 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetischen Bäume für ausgewählte Proteine mit Transitpeptid der Klasse I und III wurden mit dem Programm MEGA5 erstellt. Die Auswahl der einbezogenen Bäume erfolgte auf Grundlage der BLAST Ergebnisse. Wenn möglich bzw. bei Bedarf wurden jeweils Vertreter der Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucophyta, Chromisten, Apicomplexa und Cyanobakterien mit einbezogen. Das Alignment erfolgte mit dem CLUSTAL-Algorithmus. Nach dem Alignment wurden die Zielsteuerungssequenzen aus dem Alignment entfernt und somit diente ausschließlich der mature Teil des Proteins als Grundlage für die Berechnung. Die Assemblierung der Bäume erfolgte auf *maximum likelihood* Basis mit 500 *bootstrap* Wiederholungen. Weiterhin wurden alle Stellen für das Jone-Taylor-Thornton Model berücksichtigt und der *nearest-neighbor-interchange* Interferenz Methode gewählt.

8 Literatur

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., & Taylor, M.F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 399-451.
- Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W., & Rapaport, D. (2005). Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **280**, 48-53.
- Akita, M., Nielsen, E., & Keegstra, K. (1997). Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J Cell Biol* **136**, 983-994.
- Albiniak, A.M., Baglieri, J., & Robinson, C. (2012). Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane. *J Exp Bot* **63**, 1689-1698.
- Allen, C.A., Allen, J.F., & Puthiyaveetil, S. (2005). Energy transduction anchors genes in organelles. *BioEssays* **27**, 426-435.
- Allen, J.F. (2003). Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics* **4**, 31-36.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Apt, K.E., Kroth-Pancic, P.G., & Grossman, A.R. (1996). Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* **252**, 572-579.
- Archibald, J.M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* **19**, R81-88.
- Bachvaroff, T.R., & Place, A.R. (2008). From stop to start: Tandem gene arrangement, copy number and trans-splicing sites in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *PLoS One* **3**, e2929.
- Balsera, M., Goetze, T.A., Kovács-Bogdán, E., Schürmann, P., Wagner, R., Buchanan, B.B., Soll, J., & Bölter, B. (2009). Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca²⁺ and a stromal regulatory disulfide bridge. *J Biol Chem* **284**, 2603-2616.
- Barbrook, A.C., & Howe, C.J. (2000). Minicircular plastid DNA in the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Mol Gen Genet* **263**, 152-158.
- Barbrook, A.C., Symington, H., Nisbet, R.E., Larkum, A., & Howe, C.J. (2001). Organisation and expression of the plastid genome of the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Molecular genetics and genomics : MGG* **266**, 632-638.
- Barbrook, A.C., Santucci, N., Plenderleith, L.J., Hiller, R.G., & Howe, C.J. (2006). Comparative analysis of dinoflagellate chloroplast genomes reveals rRNA and tRNA genes. *BMC Genomics* **15**, 1-15.
- Barbrook, A.C., Dorrell, R.G., Burrows, J., Plenderleith, L.J., Nisbet, R.E., & Howe, C.J. (2012). Polyuridylation and processing of transcripts from multiple gene minicircles in chloroplasts of the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Plant Mol Biol* **79**, 347-357.
- Becker, T., Jelic, M., Vojta, A., Radunz, A., Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Preprotein recognition by the TOC complex. *EMBO J* **23**, 520-530.
- Becker, T., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Stojanovski, D., Milenkovic, D., Kutik, S., Pfanner, N., Meisinger, C., & Wiedemann, N. (2008). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J Biol Chem* **283**, 120-127.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.

- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H., & Tromp, M.C.** (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**, 819-826.
- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A., & Elofsson, A.** (2009). TOPCONS: Consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res* **37**, W465-468.
- Bhaya, D., & Grossman, A.** (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol Gen Genet* **229**, 400-404.
- Birnboim, H.C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bodansky, S., Mintz, L.B., & Holmes, D.S.** (1979). The mesokaryote *Gyrodinium cohnii* lacks nucleosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **88**, 1329-1336.
- Bolte, K., Bullmann, L., Hempel, F., Bozarth, A., Zauner, S., & Maier, U.G.** (2009). Protein targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol* **56**, 9-15.
- Bölter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., & Wagner, R.** (1998). Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15831-15836.
- Bouligand, Y., & Norris, V.** (2001). Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states. *Biochimie* **83**, 187-192.
- Bozarth, A.** (2010). Investigation of dinoflagellate plastid protein transport using heterologous and homologous *in vivo* systems. Dissertation. Am Fachbereich Biologie. Philipps-Universität Marburg.
- Bozarth, A., Grosche, C., Gould, S.B., Lieske, S., Weber, C., & Zauner, S.** (2012). Heterologous *in vivo* plastid import using dinoflagellate targeting signals. *J Eukaryot Microbiol*. **Eingereicht**.
- Braukmann, T.W., Kuzmina, M., & Stefanovic, S.** (2009). Loss of all plastid *ndh* genes in Gnetales and conifers: Extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny. *Curr Genet* **55**, 323-337.
- Brennicke, A., Marchfelder, A., & Binder, S.** (1999). RNA editing. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 297-316.
- Broughton, M.J., Howe, C.J., & Hiller, R.G.** (2006). Distinctive organization of genes for light-harvesting proteins in the cryptophyte alga *Rhodomonas*. *Gene* **369**, 72-79.
- Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeier, R., Hempel, F., Maier, U.G., & Schleiff, E.** (2010). Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem* **285**, 6848-6856.
- Cavalier-Smith, T.** (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 347-366.
- Cavalier-Smith, T.** (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* **5**, 174-182.
- Cavalier-Smith, T.** (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 109-134.
- Cavalier-Smith, T.** (2004). Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* **271**, 1251-1262.
- Chaal, B.K., & Green, B.R.** (2005). Protein import pathways in 'complex' chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor. *Plant Mol Biol* **57**, 333-342.
- Chan, C.X., Yang, E.C., Banerjee, T., Yoon, H.S., Martone, P.T., Estevez, J.M., & Bhattacharya, D.** (2011). Red and green algal monophyly and extensive gene sharing found in a rich repertoire of red algal genes. *Curr Biol* **21**, 328-333.
- Chateigner-Boutin, A.-L., & Small, I.** (2011). Organellar RNA editing. *WIREs RNA* **2**, 493-506.
- Chou, M.L., Chu, C.C., Chen, L.J., Akita, M., & Li, H.M.** (2006). Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* **175**, 893-900.
- Chow, M., Yan, K., Bennett, M., & Wong, J.** (2010). Birefringence and DNA condensation of liquid crystalline chromosomes. *Eukaryot Cell* **9**, 1577-1587.

- Chris Blazier, J., Guisinger, M.M., & Jansen, R.K. (2011). Recent loss of plastid-encoded *ndh* genes within *Erodium* (Geraniaceae). *Plant Mol Biol* **76**, 263-272.
- Chun, E.H.L., Vaughan Jr, M.H., & Rich, A. (1963). The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J Mol Biol* **7**, 130-141.
- Covello, P.S., & Gray, M.W. (1989). RNA editing in plant mitochondria. *Nature* **341**, 662-666.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., & Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-1190.
- Crum, H. (1972). The geographic origins of the mosses of North America's eastern deciduous forest. *J Hattori Bot Lab* **35**, 269-298.
- Cummins, H., & Wyatt, R. (1981). Genetic variability in natural populations of the moss *Atrichum angustatum*. *The Bryologist* **84**, 30-38.
- Daley, D.O., & Whelan, J. (2005). Why genes persist in organelle genomes. *Gen Biol* **6**, R110.
- Dang, Y., & Green, B.R. (2010). Long transcripts from dinoflagellate chloroplast minicircles suggest "rolling circle" transcription. *J Biol Chem* **285**, 5196-5203.
- Dembowski, M., Kunkle, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W., & Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **276**, 17679-17685.
- Deschamps, P., & Moreira, D. (2012). Re-evaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol Evo*, 10.1093/gbe/evs1053.
- Dhanoo, P.K., Richardson, L.G., Smith, M.D., Gidda, S.K., Henderson, M.P., Andrews, D.W., & Mullen, R.T. (2010). Distinct pathways mediate the sorting of tail-anchored proteins to the plastid outer envelope. *PLoS ONE* **5**, e10098.
- Dinter, A., & Berger, E.G. (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**, 571-590.
- Dorrell, R.G., & Smith, A.G. (2011). Do red and green make brown?: Perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. *Eukaryot Cell* **10**, 856-868.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L.T., Wu, X., Reith, M., Cavalier-Smith, T., & Maier, U.G. (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**, 1091-1096.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Carrer, H., & Bock, R. (2000). The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *The Plant Journal* **22**, 97-104.
- Drescher, A., Hupfer, H., Nickel, C., Albertazzi, F., Hohmann, U., Herrmann, R.G., & Maier, R.M. (2002). C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: Conventional editing in an unconventional small reading frame? *Mol Genet Genomics* **267**, 262-269.
- Durnford, D.G., & Gray, M.W. (2006). Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryot Cell* **5**, 2079-2091.
- Elkehal, R., Becker, T., Sommer, M.S., Koniger, M., & Schleiff, E. (2012). Specific lipids influence the import capacity of the chloroplast outer envelope precursor protein translocon. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1033-1040.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., & von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- Faivre-Nitschke, S.E., Grienemberger, J.M., & Gualberto, J.M. (1999). A prokaryotic-type cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana* gene expression and functional characterization. *Eur J Biochem* **263**, 896-903.
- Fast, N.M., Kissinger, J.C., Roos, D.S., & Keeling, P.J. (2001). Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* **18**, 418-426.

- Felsner, G., Sommer, M.S., & Maier, U.G. (2010). The physical and functional borders of transit peptide-like sequences in secondary endosymbionts. *BMC Plant Biol* **10**, 223.
- Felsner, G., Sommer, M.S., Gruenheit, N., Hempel, F., Moog, D., Zauner, S., Martin, W., & Maier, U.G. (2011). ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane. *Genome Biol Evo* **3**, 140-150.
- Ferro, M., Brugiére, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C., & Rolland, N. (2010). AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1063-1084.
- Forrest, L.L. (2011). Deep sequencing of *Ptilidium* (Ptilidiaceae) suggests evolutionary stasis in liverwort plastid genome structure. *Plant Ecol Evo* **144**, 29-43.
- Frey, W., Stech, M., & Fischer, E. (2009). Bryophytes and seedless vascular plants. In *Syllabus of plant families - A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, W. Frey, Hrsg (Berlin/Stuttgart: Borntraeger).
- Freyer, R., Kiefer-Meyer, M.C., & Kossel, H. (1997). Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6285-6290.
- Frommolt, R., Werner, S., Paulsen, H., Goss, R., Wilhelm, C., Zauner, S., Maier, U.G., Grossman, A.R., Bhattacharya, D., & Lohr, M. (2008). Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. *Mol Biol Evol* **25**, 2653-2667.
- Fujii, S., & Small, I. (2011). The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol* **191**, 37-47.
- Gao, L., Zhou, Y., Wang, Z.-W., Su, Y.-J., & Wang, T. (2011). Evolution of the *rpoB-psbZ* region in fern plastid genomes: Notable structural rearrangements and highly variable intergenic spacers. *BMC Plant Biol* **11**, 64.
- Gautier, A., Michel-Salamin, L., Tosi-Couture, E., McDowall, A.W., & Dubochet, J. (1986). Electron microscopy of the chromosomes of dinoflagellates *in situ*: Confirmation of Bouligand's liquid crystal hypothesis. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **97**, 10-30.
- Gibbs, S.P. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann N Y Acad Sci* **361**, 193-208.
- Gilson, P.R., Su, V., Slamovits, C.H., Reith, M.E., Keeling, P.J., & McFadden, G.I. (2006). Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: Nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9566-9571.
- Gott, J.M., & Emeson, R.B. (2000). Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet* **34**, 499-531.
- Gould, S.B., Fan, E., Hempel, F., Maier, U.G., & Klösgen, R.B. (2007). Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *J Biol Chem* **282**, 30295-30302.
- Gray, M.W., Burger, G., & Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Green, B.R. (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J* **66**, 34-44.
- Grosche, C. (2009). RNA-Edierung im Lebermoos *Pellia endivifolia* und dem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten *Amphidinium carterae*. Diplomarbeit. Am Fachbereich Biologie. Philipps-Universität Marburg.
- Grosche, C., Funk, H.T., Maier, U.G., & Zauner, S. (2012). The chloroplast genome of *Pellia endivifolia*: Gene content, RNA-Editing pattern and the origin of chloroplast editing. *Genome Biology and Evolution*. **Eingereicht**.
- Grosche, C., Hempel, F., Bolte, K., Abram, L., Maier, U.G., & Zauner, S. (2013). Protein import into complex plastids: Current findings and perspectives. In *Endosymbiosis*, W. Löffelhardt, Hrsg (Wien: Springer). **Eingereicht**.
- Groth-Malonek, M., Wahrmund, U., Polsakiewicz, M., & Knoop, V. (2007). Evolution of a pseudogene: Exclusive survival of a functional mitochondrial *nad7* gene supports

- Haplomitrium* as the earliest liverwort lineage and proposes a secondary loss of RNA Editing in Marchantiidae. *Mol Biol Evol* **24**, 1068-1074.
- Gualberto, J.M., Weil, J.H., & Grienenberger, J.M.** (1990). Editing of the wheat *coxIII* transcript: evidence for twelve C to U and one U to C conversions and for sequence similarities around editing sites. *Nucleic Acids Res* **18**, 3771-3776.
- Guisinger, M.M., Kuehl, J.V., Boore, J.L., & Jansen, R.K.** (2008). Genome-wide analyses of Geraniaceae plastid DNA reveal unprecedented patterns of increased nucleotide substitutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18424-18429.
- Hackett, J.D., Yoon, H.S., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Nosenko, T., & Bhattacharya, D.** (2004). Migration of the plastid genome to the nucleus in a peridinin dinoflagellate. *Curr Biol* **14**, 213-218.
- Hagopian, J.C., Reis, M., Kitajima, J.P., Bhattacharya, D., & de Oliveira, M.C.** (2004). Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *J Mol Evol* **59**, 464-477.
- Hallick, R.B., Hong, L., Drager, R.G., Favreau, M.R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A., & Stutz, E.** (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res* **21**, 3537-3544.
- Hammani, K., Okuda, K., Tanz, S.K., Chateigner-Boutin, A.L., Shikanai, T., & Small, I.** (2009). A study of new *Arabidopsis* chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell* **21**, 3686-3699.
- Hanson, M.R., Sutton, C., & Luis, B.** (1996). Plant organelle gene expression: Altered by RNA editing. *Trends Plant Sci* **1**, 57-64.
- Heinrichs, J., Hentschel, J., Wilson, R., Feldberg, K., & Schneider, H.** (2007). Evolution of leafy liverworts (Jungermanniidae, Marchantiophyta): Estimating divergence times from chloroplast DNA sequences using penalized likelihood with integrated fossil evidence. *Taxon* **56**, 31-44.
- Hempel, F., Bullmann, L., Lau, J., Zauner, S., & Maier, U.G.** (2009). ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Biol Evol* **26**, 1781-1790.
- Hessa, T., Reithinger, J.H., von Heijne, G., & Kim, H.** (2009). Analysis of transmembrane helix integration in the endoplasmic reticulum in *S. cerevisiae*. *J Mol Biol* **386**, 1222-1228.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H., & von Heijne, G.** (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**, 377-381.
- Hibberd, D.J., & Norris, R.E.** (1984). Cytology and Ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta Divisio Nova, Chlorarachniophyceae Classis Nova). *J Phycol* **20**, 310-330.
- Hiesel, R., Wissinger, B., Schuster, W., & Brennicke, A.** (1989). RNA editing in plant mitochondria. *Science* **246**, 1632-1634.
- Hiller, R.G.** (2001). 'Empty' minicircles and *petB/atpA* and *psbD/psbE* (cytb559 alpha) genes in tandem in *Amphidinium carterae* plastid DNA. *FEBS Lett* **505**, 449-452.
- Hirakawa, Y., Nagamune, K., & Ishida, K.** (2009). Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12820-12825.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S.** (1998). SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-379.
- Hirose, T., & Sugiura, M.** (1997). Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: A possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* **16**, 6804-6811.
- Hirose, T., & Sugiura, M.** (2001). Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: Development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *EMBO J* **20**, 1144-1152.

- Hirose, T., Kusumegi, T., Tsudzuki, T., & Sugiura, M. (1999). RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: Editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet* **262**, 462-467.
- Hjorth, E., Hadfi, K., Zauner, S., & Maier, U.G. (2005). Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**, 1129-1135.
- Hoch, B., Maier, R.M., Appel, K., Igloi, G.L., & Kossel, H. (1991). Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* **353**, 178-180.
- Hofmann, N.R., & Theg, S.M. (2005a). Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends Plant Sci* **10**, 450-457.
- Hofmann, N.R., & Theg, S.M. (2005b). Protein- and energy-mediated targeting of chloroplast outer envelope membrane proteins. *Plant J* **44**, 917-927.
- Hoppenrath, M., & Leander, B.S. (2010). Dinoflagellate phylogeny as inferred from heat shock protein 90 and ribosomal gene sequences. *PLoS One* **5**, e13220.
- Howe, C., Nisbet, R., & AC. (2008). The remarkable chloroplast genome of dinoflagellates. *J Exp Bot* **59**, 1035-1045.
- Howe, C.J., Barbrook, A.C., Koumandou, L.V., Nisbet, R.E., Symington, H.A., & Wightman, T.F. (2003). Evolution of the chloroplast genome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 99-107.
- Inaba, T., & Schnell, D.J. (2008). Protein trafficking to plastids: One theme, many variations. *Biochem J* **413**, 15-28.
- Inaba, T., Li, M., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F., & Schnell, D.J. (2003). atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J Biol Chem* **278**, 38617-38627.
- Ishida, K., Cavalier-Smith, T., & Green, B.R. (2000). Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromista). *J Phycol* **36**, 1135-1144.
- Janoušková, J., Horak, A., Obornik, M., Lukes, J., & Keeling, P.J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10949-10954.
- Jiang, Y., Fan, S.L., Song, M.Z., Yu, J.N., & Yu, S.X. (2012). Identification of RNA editing sites in cotton (*Gossypium hirsutum*) chloroplasts and editing events that affect secondary and three-dimensional protein structures. *Genet Mol Res* **11**, 987-1001.
- Johnson, M.D. (2011). The acquisition of phototrophy: Adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles. *Photosynth Res* **107**, 117-132.
- Keeling, P.J. (2009). Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol* **56**, 1-8.
- Keeling, P.J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 729-748.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H.A., & Schnell, D.J. (1994). Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1035-1039.
- Khakhlova, O., & Bock, R. (2006). Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion. *Plant J* **46**, 85-94.
- Khan, H., Parks, N., Kozera, C., Curtis, B.A., Parsons, B.J., Bowman, S., & Archibald, J.M. (2007). Plastid genome sequence of the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319 : Lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Mol Biol Evol* **24**, 1832-1842.
- Kilian, O., & Kroth, P.G. (2004). Presequence acquisition during secondary endocytobiosis and the possible role of introns. *J Mol Evol* **58**, 712-721.
- Kitajima, A., Asatsuma, S., Okada, H., Hamada, Y., Kaneko, K., Nanjo, Y., Kawagoe, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Takeuchi, M., Nakano, A., & Mitsui, T. (2009). The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids. *Plant Cell* **21**, 2844-2858.

- Kleine, T., Maier, U.G., & Leister, D. (2009). DNA transfer from organelles to the nucleus : The idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 115-138.
- Knoop, V. (2011). When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. *Cell Mol Life Sci* **68**, 567-586.
- Kotera, E., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326-330.
- Koumandou, V.L., & Howe, C.J. (2007). The copy number of chloroplast gene minicircles changes dramatically with growth phase in the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Protist* **158**, 89-103.
- Kouranov, A., & Schnell, D.J. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* **139**, 1677-1685.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., & Schnell, D.J. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol* **143**, 991-1002.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E., & Pfanner, N. (2001). Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol* **152**, 289-300.
- Kugita, M., Yamamoto, Y., Fujikawa, T., Matsumoto, T., & Yoshinaga, K. (2003). RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res* **31**, 2417-2423.
- Kusumi, J., & Tachida, H. (2005). Compositional properties of green-plant plastid genomes. *J Mol Evol* **60**, 417-425.
- Laatsch, T., Zauner, S., Kowallik, K.V., & Maier, U.G. (2004). Plastid-derived single gene minicircles of the dinoflagellate *Ceratium horridum* are localized in the nucleus. *Mol Biol Evol* **21**, 1318-1322.
- Lacey, W.S. (1969). Fossil bryophytes. *Biol Rev Camb Philos Soc* **44**, 189-200.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lajeunesse, T.C., Lambert, G., Andersen, R.A., Coffroth, M.A., & Galbraith, D.W. (2005). *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *J Phycol* **41**, 880.
- Lang, M., Apt, K.E., & Kroth, P.G. (1998). Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. *J Biol Chem* **273**, 30973-30978.
- Lee, S.B., Kaitanis, C., Jansen, R.K., Hostetler, J.B., Tallon, L.J., Town, C.D., & Daniell, H. (2006). The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: Organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Genomics* **7**, 61.
- Lee, Y.J., Kim, D.H., Kim, Y.W., & Hwang, I. (2001). Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane system *in vivo*. *Plant Cell* **13**, 2175-2190.
- Lee, Y.J., Sohn, E.J., Lee, K.H., Lee, D.W., & Hwang, I. (2004). The transmembrane domain of AtToc64 and its C-terminal lysine-rich flanking region are targeting signals to the chloroplast outer envelope membrane. *Mol Cells* **17**, 281-291.
- Leister, D. (2005). Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet* **21**, 655-663.
- Leung, S.K., & Wong, J.T. (2009). The replication of plastid minicircles involves rolling circle intermediates. *Nucleic Acids Res* **37**, 1991-2002.
- Li, H.M., & Chen, L.J. (1996). Protein targeting and integration signal for the chloroplastic outer envelope membrane. *Plant Cell* **8**, 2117-2126.
- Lidie, K.B., & van Dolah, F.M. (2007). Spliced leader RNA-mediated trans-splicing in a dinoflagellate, *Karenia brevis*. *J Eukaryot Microbiol* **54**, 427-435.
- Lin, S. (2011). Genomic understanding of dinoflagellates. *Res Microbiol* **162**, 551-569.

- Lin, S., Zhang, H., & Gray, M.W. (2007). RNA Editing in dinoflagellates and its implications for the evolutionary history of the editing machinery. In *RNA and DNA Editing*, H.C. Smith, Hrsg (New York: John Wiley & Sons), pp. 280-309.
- Liu, L., & Hastings, J.W. (2006). Novel and rapidly diverging intergenic sequences between tandem repeats of the luciferase genes in seven dinoflagellate species. *J Phycol* **42**, 96-103.
- Lohse, M., Drechsel, O., & Bock, R. (2007). OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): A tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr Genet* **52**, 267-274.
- Lukeš, J., Leander, B.S., & Keeling, P.J. (2009). Cascades of convergent evolution: The corresponding evolutionary histories of euglenozoans and dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9963-9970.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lechamy, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-p., Szurek, B., Taconnat, L., & Small, I. (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103.
- Maier, R.M., Hoch, B., Zeltz, P., & Kossel, H. (1992). Internal editing of the maize chloroplast ndhA transcript restores codons for conserved amino acids. *Plant Cell* **4**, 609-616.
- Maier, R.M., Zeltz, P., Kossel, H., Bonnard, G., Gualberto, J.M., & Grienemberger, J.M. (1996). RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* **32**, 343-365.
- Maier, U.G., Douglas, S.E., & Cavalier-Smith, T. (2000). The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* **151**, 103-109.
- Maier, U.G., Bozarth, A., Funk, H.T., Zauner, S., Rensing, S.A., Schmitz-linneweber, C., Börner, T., & Tillich, M. (2008). Complex chloroplast RNA metabolism : Just debugging the genetic programme? *BMC Biology* **9**, 1-9.
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. (New Haven: Yale University Press).
- Martin, W., & Herrmann, R.G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol* **118**, 9-17.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., & Kowallik, K.V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162-165.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., & Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12246-12251.
- McFadden, G.I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 513-519.
- McFadden, G.I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Plant Cell* **959**, 951-959.
- McFadden, G.I., & Dooren, G.G.V. (2004). Evolution : Red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol* **14**, 514-516.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riano-Pachon, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J.,

- Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W.C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., & Grossman, A.R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-250.
- Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Botanisches Centralblatt* **25**, 593-604.
- Miyata, Y., & Sugita, M. (2004). Tissue- and stage-specific RNA editing of *rps14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. *J Plant Physiol* **161**, 113-115.
- Miyata, Y., Sugiura, C., Kobayashi, Y., Hagiwara, M., & Sugita, M. (2002). Chloroplast ribosomal S14 protein transcript is edited to create a translation initiation codon in the moss *Physcomitrella patens*. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 346-349.
- Moore, R.B., Ferguson, K.M., Loh, W.K., Hoegh-Guldberg, O., & Carter, D.A. (2003). Highly organized structure in the non-coding region of the *psbA* minicircle from clade C *Symbiodinium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1725-1734.
- Moore, R.B., Oborník, M., Janouškovec, J., Chrudimský, T., Vancová, M., Green, D.H., Wright, S.W., Davies, N.W., Bolch, C.J.S., Heimann, K., Šlapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J.M., & Carter, D.A. (2008). A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**, 959-963.
- Morse, D., Salois, P., Markovic, P., & Hastings, J.W. (1995). A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. *Science* **268**, 1622-1624.
- Morton, B.R. (1998). Selection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages. *J Mol Evol* **46**, 449-459.
- Morton, B.R. (2003). The role of context-dependent mutations in generating compositional and codon usage bias in grass chloroplast DNA. *J Mol Evol* **56**, 616-629.
- Morton, B.R., Oberholzer, V.M., & Clegg, M.T. (1997). The influence of specific neighboring bases on substitution bias in noncoding regions of the plant chloroplast genome. *J Mol Evol* **45**, 227-231.
- Moszczyński, K., Mackiewicz, P., & Budył, A. (2012). Evidence for horizontal gene transfer from bacteroidetes bacteria to dinoflagellate minicircles. *Mol Biol Evol* **29**, 887-892.
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K., & Bhattacharya, D. (2009). Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**, 1724-1726.
- Müller, M., & Klösgen, R.B. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (Review). *Mol Membr Biol* **22**, 113-121.
- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Munoz, F.J., Rodriguez-Lopez, M., Baroja-Fernandez, E., & Pozueta-Romero, J. (2006). Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 2582-2592.
- Nash, E.A., Barbrook, A.C., Edwards-stuart, R.K., Bernhardt, K., Howe, C.J., & Nisbet, R.E.R. (2007). Organization of the mitochondrial genome in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Biosystems* **24**, 1528-1536.
- Nassoury, N., Cappadocia, M., & Morse, D. (2003). Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci* **116**, 2867-2874.
- Nassoury, N., Wang, Y., & Morse, D. (2005). Brefeldin A inhibits circadian remodeling of chloroplast structure in the dinoflagellate *Gonyaulax*. *Traffic* **6**, 548-561.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C., & Robinson, D. (2002). Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* **130**, 1102-1108.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Nisbet, R.E.R., Koumandou, L.V., Barbrook, A.C., & Howe, C.J. (2004). Novel plastid gene minicircles in the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Gene* **331**, 141-147.
- O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M., & Small, I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* **25**, 1120-1128.
- Ohyama, K., Takemura, M., Oda, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Nakayama, S., Ishizaki, K., Fujisawa, M., & Yamato, K. (2009). Gene content, organization and molecular evolution of plant organellar genomes and sex chromosomes: Insights from the case of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 108-124.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.-i., Inokuchi, H., & Ozeki, H. (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**, 572-574.
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horak, A., Leander, B.S., & Keeling, P.J. (2009). Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS One* **4**, e7080.
- Okuda, K., Chateigner-Boutin, A.L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I., & Shikanai, T. (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* **21**, 146-156.
- Oldenburg, D.J., & Bendich, A.J. (2004). Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol* **335**, 953-970.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C.J., & Dalbey, R.E. (2002). Signal peptidases. *Chem Rev* **102**, 4549-4580.
- Palmer, J.D., & Logsdon, J.M. (1991). The recent origins of introns. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 470-477.
- Parkinson, C.L., Mower, J.P., Qiu, Y.-l., Shirk, A.J., Song, K., Young, N.D., W, C., & Palmer, J.D. (2005). Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae. *BMC Evol Biol* **12**, 1-12.
- Patron, N.J., & Waller, R.F. (2007). Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays* **29**, 1048-1058.
- Patron, N.J., Waller, R.F., Archibald, J.M., & Keeling, P.J. (2005). Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *J Mol Biol* **348**, 1015-1024.
- Pawlowski, J.A.N., Holzmann, M., Fahrni, J.F., Pochon, X., & Lee, J.J. (2001). Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* **48**, 368-373.
- Pfanzagl, B., Zenker, A., Pittenauer, E., Allmaier, G., Martinez-Torrecuadrada, J., Schmid, E.R., De Pedro, M.A., & Löffelhardt, W. (1996). Primary structure of cyanelle peptidoglycan of *Cyanophora paradoxa*: A prokaryotic cell wall as part of an organelle envelope. *J Bacteriol* **178**, 332-339.
- Popov-Celeketi, J., Waizenegger, T., & Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* **376**, 671-680.
- Qi, Y., Armbruster, U., Schmitz-Linneweber, C., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., Ruhle, T., Small, I., Jahns, P., & Leister, D. (2012). *Arabidopsis* CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. *J Exp Bot* **63**, 1251-1270.
- Qiu, Y.-l., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., & Davis, C.C. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15511-15516.

- Rapaport, D., & Neupert, W.** (1999). Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* **146**, 321-331.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., & Keegstra, K.** (1999). The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: Identification of a cyanobacterial homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 784-789.
- Reynolds, E.S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.
- Richter, S., & Lamppa, G.K.** (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7463-7468.
- Ris, H., & Plaut, W.** (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **13**, 383-391.
- Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A., & Robinson, D.G.** (2002). Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco bright yellow 2 cells expressing Golgi-targeted Green Fluorescent Protein and COPI Antisera. *Plant Cell* **14**, 237-261.
- Rivals, E., Bruyere, C., Toffano-Nioche, C., & Lecharny, A.** (2006). Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* **141**, 825-839.
- Rodriguez-Espeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Loffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., & Lang, B.F.** (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* **15**, 1325-1330.
- Rogers, M.B., Gilson, P.R., Su, V., McFadden, G.I., & Keeling, P.J.** (2007). The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloniella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol* **24**, 54-62.
- Rudhe, C., Clifton, R., Chew, O., Zemam, K., Richter, S., Lamppa, G., Whelan, J., & Glaser, E.** (2004). Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* **343**, 639-647.
- Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., & Knoop, V.** (2008). Organellar RNA editing and plant-specific extensions of pentatricopeptide repeat proteins in jungermanniid but not in marchantiid liverworts. *Mol Biol Evol* **25**, 1405-1414.
- Rüdinger, M., Funk, H.T., Rensing, S.A., Maier, U.G., & Knoop, V.** (2009). RNA editing: Only eleven sites are present in the *Physcomitrella patens* mitochondrial transcriptome and a universal nomenclature proposal. *Mol Genet Genomics* **281**, 473-481.
- Rüdinger, M., Volkmar, U., Lenz, H., Groth-Malonek, M., & Knoop, V.** (2012). Nuclear DYW-Type PPR gene families diversify with increasing RNA editing frequencies in liverwort and moss mitochondria. *J Mol Evol* **74**, 37-51.
- Salone, V., Rudinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V., & Lurin, C.** (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett* **581**, 4132-4138.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **6**, 283-290.
- Schaffner, W., & Weissmann, C.** (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* **56**, 502-514.
- Schattner, P., Brooks, A.N., & Lowe, T.M.** (2005). The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res* **33**, W686-689.
- Schimper, A.F.W.** (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung* **41**, 106-114.
- Schleiff, E., Motzkus, M., & Soll, J.** (2002). Chloroplast protein import inhibition by a soluble factor from wheat germ lysate. *Plant Mol Biol* **50**, 177-185.
- Schleiff, E., Tien, R., Salomon, M., & Soll, J.** (2001). Lipid composition of outer leaflet of chloroplast outer envelope determines topology of OEP7. *Mol Biol Cell* **12**, 4090-4102.

- Schmitz-Linneweber, C., & Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: A socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**, 663-670.
- Schmitz-Linneweber, C., Tillich, M., Herrmann, R.G., & Maier, R.M. (2001). Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: Allotetraploidy provides trans-factors. *EMBO J* **20**, 4874-4883.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T.G., Hupfer, H., Herrmann, R.G., & Maier, R.M. (2002). The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: The role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* **19**, 1602-1612.
- Schnell, D.J., Kessler, F., & Blobel, G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**, 1007-1012.
- Schnell, D.J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K., & Soll, J. (1997). A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol* **7**, 303-304.
- Schnepf, E., & Deichgräber, G. (1984). "Myzocytosis", a kind of endocytosis with implications to compartmentation in endosymbiosis. *Naturwissenschaften* **71**, 218-219.
- Schnepf, E., & Elbrächter, M. (1999). Dinophyte chloroplasts and phylogeny - A review. *Grana* **38**, 81-97.
- Schuster, W., Hiesel, R., Wissinger, B., & Brennicke, A. (1990). RNA editing in the cytochrome b locus of the higher plant *Oenothera lamarckiana* includes a U-to-C transition. *Mol Cell Biol* **10**, 2428-2431.
- Sharpe, H.J., Stevens, T.J., & Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* **142**, 158-169.
- Sláviková, S., Vacula, R., Fang, Z., Ehara, T., Osafune, T., & Schwartzbach, S.D. (2005). Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*. *J Cell Sci* **118**, 1651-1661.
- Small, I.D., & Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**, 46-47.
- Smith, D.R. (2009). Unparalleled GC content in the plastid DNA of *Selaginella*. *Plant Mol Biol* **71**, 627-639.
- Sommer, M.S., Gould, S.B., Lehmann, P., Gruber, A., Przyborski, J.M., & Maier, U.G. (2007). Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol* **24**, 918-928.
- Sommer, M.S., Daum, B., Gross, L.E., Weis, B.L., Mirus, O., Abram, L., Maier, U.G., Kuhlbrandt, W., & Schleiff, E. (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13841-13846.
- Spector, D.L. (1984). Dinoflagellate nuclei. In *Dinoflagellates*, D.L. Spector, Hrsg (New York: Academic Press), pp. 107-147.
- Spork, S., Hiss, J.A., Mandel, K., Sommer, M., Kooij, T.W., Chu, T., Schneider, G., Maier, U.G., & Przyborski, J.M. (2009). An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **8**, 1134-1145.
- Steiner, J.M., & Löffelhardt, W. (2002). Protein import into cyanelles. *Trends Plant Sci* **7**, 72-77.
- Steinhauser, S., Beckert, S., Capesius, I., Malek, O., & Knoop, V. (1999). Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol*, 303-312.
- Stirewalt, V., Michalowski, C., Löffelhardt, W., Bohnert, H., & Bryant, D. (1995). Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol Biol Report* **13**, 327-332.
- Sugita, M., Miyata, Y., Maruyama, K., Sugiura, C., Arikawa, T., & Higuchi, M. (2006). Extensive RNA editing in transcripts from the *psbB* operon and *rpoA* gene of plastids from the enigmatic moss *Takakia lepidozioides*. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 2268-2274.
- Sugiura, C., Kobayashi, Y., Aoki, S., Sugita, C., & Sugita, M. (2003). Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: Evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res* **31**, 5324-5331.

- Sugiura, M. (1995). The chloroplast genome. *Essays Biochem* **30**, 49-57.
- Sulli, C., & Schwartzbach, S.D. (1995). The polyprotein precursor to the *Euglena* light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing. *J Biol Chem* **270**, 13084-130901.
- Sulli, C., & Schwartzbach, S.D. (1996). A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor. *The Plant Cell* **8**, 43-53.
- Sulli, C., Fang, Z.W., Muchhal, U., & Schwartzbach, S.D. (1999). Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within Endoplasmic Reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *J Biol Chem* **274**, 457-463.
- Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P.D., & van Wijk, K.J. (2009). PPDB, the Plant proteomics database at Cornell. *Nucleic Acids Res* **37**, D969-974.
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Verbitskiy, D., Kugelmann, M., Härtel, B., & Brennicke, A. (2012). Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Takishita, K., Ishida, K., & Maruyama, T. (2003). An enigmatic GAPDH gene in the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium* and its related species (the order Suessiales): Possible lateral gene transfer between two eukaryotic algae, dinoflagellate and euglenophyte. *Protist* **154**, 443-454.
- Takishita, K., Ishida, K., & Maruyama, T. (2004). Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted GAPDH gene supports separate origins for the peridinin- and the fucoxanthin derivative-containing plastids of dinoflagellates. *Protist* **155**, 447-458.
- Takishita, K., Kawachi, M., Noel, M.H., Matsumoto, T., Kakizoe, N., Watanabe, M.M., Inouye, I., Ishida, K., Hashimoto, T., & Inagaki, Y. (2008). Origins of plastids and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Gene* **410**, 26-36.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Taylor, F. (1990). Phylum Dinoflagellata. In *Handbook of protocista: The structure, cultivation, habitats and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants of animal, plants and fungi*, L. Margulis, Corliss, J., Melkonian, M., Chapmans, D. J., Hrsg (Boston: Jones and Barlett Publishers), pp. 419-437.
- Teixeira, P.F., & Glaser, E. (2012). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 10.1016/j.bbamcr.2012.1003.1012.
- Teng, Y.S., Su, Y.S., Chen, L.J., Lee, Y.J., Hwang, I., & Li, H.M. (2006). Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* **18**, 2247-2257.
- Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B.R., & Maier, U.G. (2006). The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol* **23**, 1912-1921.
- Tillich, M., Funk, H.T., Schmitz-Linneweber, C., Poltnigg, P., Sabater, B., Martin, M., & Maier, R.M. (2005). Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J* **43**, 708-715.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**, 123-135.
- Tonkin, C.J., Kalanon, M., & McFadden, G.I. (2008). Protein targeting to the malaria parasite plastid. *Traffic* **9**, 166-175.
- Tonkin, C.J., Struck, N.S., Mullin, K.A., Stimmler, L.M., & McFadden, G.I. (2006). Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol* **61**, 614-630.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

- Tu, S.L., Chen, L.J., Smith, M.D., Su, Y.S., Schnell, D.J., & Li, H.M. (2004). Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. *Plant Cell* **16**, 2078-2088.
- Ueda, M., Fujimoto, M., Arimura, S., Tsutsumi, N., & Kadowaki, K. (2006). Evidence for transit peptide acquisition through duplication and subsequent frameshift mutation of a preexisting protein gene in rice. *Mol Biol Evol* **23**, 2405-2412.
- Vacula, R., Steiner, J.M., Krajcovic, J., Ebringer, L., & Löffelhardt, W. (1999). Nucleus-encoded precursors to thylakoid lumen proteins of *Euglena gracilis* possess tripartite presequences. *DNA Res* **6**, 45-49.
- van Dooren, G.G., Tomova, C., Agrawal, S., Humbel, B.M., & Striepen, B. (2008). *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13574-13579.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L., & Samuelsson, G. (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**, 1224-1231.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**, 17-21.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., & Tommassen, J. (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262-265.
- Wakasugi, T., Hirose, T., Horihata, M., Tsudzuki, T., Kossel, H., & Sugiura, M. (1996). Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8766-8770.
- Wallas, T.R., Smith, M.D., Sanchez-Nieto, S., & Schnell, D.J. (2003). The roles of Toc34 and Toc75 in targeting the Toc159 preprotein receptor to chloroplasts. *J Biol Chem* **278**, 44289-44297.
- Wang, B., Xue, J., Li, L., Liu, Y., & Qiu, Y.L. (2009). The complete mitochondrial genome sequence of the liverwort *Pleurozia purpurea* reveals extremely conservative mitochondrial genome evolution in liverworts. *Curr Genet* **55**, 601-609.
- Wang, Y., & Morse, D. (2006). Rampant polyuridylation of plastid gene transcripts in the dinoflagellate *Lingulodinium*. *Nucleic Acid Res.* **34**, 613-619.
- Wang, Y., Joly, S., & Morse, D. (2008). Phylogeny of dinoflagellate plastid genes recently transferred to the nucleus supports a common ancestry with red algal plastid genes. *J Mol Evol* **66**, 175-184.
- Wastl, J., & Maier, U.G. (2000). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem* **275**, 23194-23198.
- Weber, A.P., Linka, M., & Bhattacharya, D. (2006). Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in plantae from an endomembrane-derived ancestor. *Eukaryot Cell* **5**, 609-612.
- Wickett, N.J., Zhang, Y., Hansen, S.K., Roper, J.M., Kuehl, J.V., Plock, S.A., Wolf, P.G., DePamphilis, C.W., Boore, J.L., & Goffinet, B. (2008). Functional gene losses occur with minimal size reduction in the plastid genome of the parasitic liverwort *Aneura mirabilis*. *Mol Biol Evol* **25**, 393-401.
- Wiese, A., Groner, F., Sonnewald, U., Deppner, H., Lerchl, J., Hebbeker, U., Flugge, U., & Weber, A. (1999). Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett* **461**, 13-18.
- Wilson, R.J., Denny, P.W., Preiser, P.R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D.J., Moore, P.W., & Williamson, D.H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **261**, 155-172.
- Woehle, C., Dagan, T., Martin, W.F., & Gould, S.B. (2011). Red and problematic green phylogenetic signals among thousands of nuclear genes from the photosynthetic and apicomplexa-related *Chromera velia*. *Genome Biol Evo* **3**, 1220-1230.

- Wolf, P.G., Rowe, C.A., & Hasebe, M.** (2004). High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: Analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Gene* **339**, 89 - 97.
- Wyatt, R., Odrzykoski, I., & Cronberg, N.** (2005). High levels of genetic variation in the haploid leafy liverwort *Porella platyphylla* from the southeastern United States. *J Bryol* **27**, 247-252.
- Zauner, S., Greilinger, D., Laatsch, T., Kowallik, K.V., & Maier, U.G.** (2004). Substitutional editing of transcripts from genes of cyanobacterial origin in the dinoflagellate *Ceratium horridum*. *Grana* **577**, 535-538.
- Zeng, W.H., Liao, S.C., & Chang, C.C.** (2007). Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts of *Phalaenopsis aphrodite* and comparative analysis with those of other seed plants. *Plant Cell Physiol* **48**, 362-368.
- Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L., Campbell, D.A., Sturm, N.R., Lin, S., & Gaasterland, T.** (2007). Spliced leader RNA trans-splicing in dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4618-4623.
- Zhang, Z., Green, B.R., & Cavalier-Smith, T.** (1999). Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* **400**, 155-159.
- Zhang, Z., Cavalier-Smith, T., & Green, B.R.** (2001). A family of selfish minicircular chromosomes with jumbled chloroplast gene fragments from a dinoflagellate. *Mol Biol Evol* **18**, 1558-1565.
- Zhang, Z., Cavalier-Smith, T., & Green, B.R.** (2002). Evolution of dinoflagellate unigenic minicircles and the partially concerted divergence of their putative replicon origins. *Mol Biol Evol* **19**, 489-500.

9 Anhang

9.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung des Plastoms und die Bestimmung des Editotypen von *Pellia endiviifolia*

Name	Sequenz	Name	Sequenz	Name	Sequenz
trnA-UGC_PE	ATTACCGCCTAGACAATTAG	ycf1rev4_PE	TTTGAGAGTTAGGATTATGC	rpoB4_PE	GAGATAGAGAAATAGCTACG
rrn16_PE	GTCGGAACAAGTGAAGAAGC	rpl2for_PE	ACACCGGGCACGCGCAATCG	rpoB5_PE	ATTACTCAAGTCATAATTCTG
psaBrev_PE	GAATTCACCCACAAATAATC	trnKseq_PE	TATGGCAGATACTCTATACG	rps11_PE	ACTCCTTTAGGTAATCTACG
psaBfor_PE	CTGCTCCTAATGCTTCAGCG	psbHseq2_PE	TGAGTCATCGGAGCCTAACG	rpl14_PE	GGGAACCCGAAAGGAACCTCG
ycf3_PE	AGAGTTTATAGGTTTTCTCG	petBseq_PE	AGAATCCTACGGCTTAAACG	rpoB6_PE	CATGAGTTAATCCCAATTTTC
trnS-GGA_PE	ATATCTAAGTAAGGATTGCG	atpFfor2_PE	CTAAAACAAGCTATAATTCTG	rpoB7_PE	GCATGCGGGGTTTAATGTCTG
19ycf3_PE	GTGGGAAACTCTCAAGTACG	atpFfor3_PE	CCGCACACACTCCCTTTCC	rpoB8_PE	TGACGAGGTTTCTCTACAGC
psaBrevout_PE	GTGAACGGGCTTTATGTGC	chlLrev2_PE	GGTTGGATCGTGAGAAGTAGC	ycf2_12PE	ATGCAGAACGGAATCTTTGC
psaBforout_PE	TTATCCCGGCATTATTACG	psaBrev4_PE	CTCAAGGTATGAGCCTTGC	cysA3_PE	ATTCGAATGGGCTATCAAGC
psbB1_PE	CTATTTTCATCTAAGTGTTTCG	petD_PE	TTTATCGTCATTGCCTGAGC	rpoC2rev4_PE	CAGGCAGGATGCCCATGACG
psbB2_PE	GATTTTGGTATCCCTAAACG	rpl2for2_PE	ATAGCAGGTAGTGAGATTCC	rpoC1for_PE	AGAGTAGATTATTCGGGTCTG
rrn16_2PE	CCTAATAACGCATCTTCACG	psbJ3_PE	TACCCATTAAACCTATCACG	rpoC1int_PE	ATATTAGAACCAACAGTTTCC
rpoB_PE	TTATTACCGTGTCTTCACG	ycf1rev5_PE	GGTGAATCGGATTCTATACG	rpoBfor_PE	GAGTAATTGATGTAGATCTG
trnL-CAA_PE	AACATGTGATATAGTTATAC	chlB_for2_PE	CATAGCAATAGATTTTACG	rpoBrev_PE	TAATCGCTTCTTTTGCTCTG
trnS-GGA_2PE	ATTGATGTAACCTTAGATGC	matK_for2_PE	TTATCGTTTTGAACCTGAAC	petNrev_PE	TTTGCAAGAAACGTGTGTCG
psbA5_PE	AACCATCCAATGTATAGACG	matK_rev2_PE	TTGCAACTTTCATTGCATAC	trnC-GCA2_PE	TCAGATTATATGTACTCTGC
psbI_PE	TAATTGGCATCACATCTACG	atpF_for_PE	TCGAGTAAACGAAAACTCC	psbM3_PE	TATTTCCGCCAAGCCATACG
rps4_5PE	ATCATAACAGAAATTCATGG	atpF_rev_PE	AAAGATGAAACTGATGAAAG	rpoC2for_PE	AGTGATCTGGCGGATGAAGC
psaBrevout2_PE	AAAACCTATCCACCAATTGC	atpI_for_PE	TTTTTGGAGGAACAACATGC	rpoBrev2_PE	CTTCATATATAAGCCGTTCTG
psbB3_PE	TGATATAGTATTGAATATGG	atpI_rev_PE	AATCAATTAATAACTGATAC	rpoC1rev_PE	TGTTTGGCTAATTTAATACG
rrn16rev_PE	GTCAGGCTTTTGCCCATTCG	chlL_for_PE	AAGAGACAGAAACATACAAG	rpoC2rev22_PE	TCCAACAAGCAACTTTGAGC
rrn45_PE	AAGGTACGCGCAAGACGAGC	chlL_rev_PE	TTTTAAACTATCGTAAATC	rps11_2PE	AAACAAACTCGAAACATTGC
psaBrev2_PE	TTATGTTCCAACATCTAGC	chlN_for_PE	TTTTTTCTATTAGAAAGGG	rpl23_for_PE	TAAAAATCTGGGGATTGTAC
psaAfor_PE	GGCAAGAAGTATCGAATCG	ndhA_for_PE	AGAGGTGATCGTTAGAATG	rpl2_rev_PE	TTTATTGAACGTGTCTTGC
atpEfor_PE	AGGCAAAAAACAAAGTATCG	ndhA_rev_PE	AATTTCTGTTGTCTCTTCG	rps19_for_PE	TACTTTTATCTCTCGTCGTC
orf169rev_PE	CCAAAGTATTAGGCATATCG	ndhH_for_PE	TAAAAGGAGAATCAATACG	rps3_rev_PE	ACGAATTAATGAATCAGG
trnK_PE	ACACGCTAAGGTTTTGGCAC	ndhH_rev_PE	TCATTCTAACGATCGACCTC	rpl16_for_PE	AACCTGATTCAATTAATTCG
trnQ_PE	AAATGTTACGCTATTATGC	rps15_for_PE	TTCAGGAGATAAAAACTCTC	rpl14_rev_PE	TTACCCATAAAAACTCCTTG
psbBfor_PE	GTGAAAAAATATGCTAGACG	rps15_rev_PE	TTCTCTTTTAATTGGTTAG	rps8_for_PE	AGGAGTTTTATGGGTAACG
trnV-GAC1_PE	AACTGACGACTTCCACCACG	ycf1_for_PE	TCAATTCTACTTTATTGAGG	rps8_rev_PE	TGCATTAGGAAGTGATTCTG
ndhBrev_PE	ATTTCCAACCCAGAGTTTCG	ycf1_rev_PE	AAAAATTGAGCTTTTGAACC	infA_for_PE	TAGTTAATTCAAAAGGAGAC
psbI2_PE	TCCTGGAGATTATGCCATGC	rps19_PE	GGTAAAGCCGGTCTTAAACG	rpl36_rev_PE	TTTAACAGATTTCGGCATAG
trnM_PE	AACAAGCCTAAGTCAATATC	psbD_PE	GATTCTGTCTCTCATAATGC	rps11_for_PE	AAACATAAACAGAGACAAGG
psbG_PE	AATTAAGACCATTCTAATGC	atpIrev2_PE	GCAACAATAATTCATCAGC	rps11_rev_PE	TACTCTATTTCATCTGAC
matK_PE	ACAAATTAACGTATTGGCTC	rps2rev3_PE	GGTACCGATCCTTTCAATAC	rpoA_for_PE	AGTTTTGTACGTGATGTGAC
trnN-GUU_PE	TTATTAGACTATTGGAAGC	petAfor_PE	TGAATGACTCTATTGTACC	rpoA_rev_PE	TGTAACCCCCCTTAAGATC
matK2_PE	TCCCACTAATCGTTATGATG	psbI4_PE	GTAATATCTGAACACTTGC	ycf2_for_PE	AATATGGGTTAGTTAGAGTC
ycf3_2PE	AGAGTTTCCCACTCATACG	atpArev2_PE	ATCCGCTTGTTTTACTTCG	ycf2_rev_PE	TATAATCATCGTTCCCGAGC
ndhBrev2_PE	TAATAATTGATTCCGTTCTC	rpl22for_PE	AGAACTTTTCGGGGACATGC	petD_for_PE	TATTCTGGCTCTACCTCG
trnV-GAC2_PE	CATGCTCGACTCGTGATACG	psbM_PE	GAATGATCAAAATCAATACC	petD_rev_PE	TTCTTCATCGGTAATCAATG
matK3_PE	TGGTCATGATACTAAGAAG	rbclrev2_PE	AGCATCAGTTAAACCCGTGC	petB_for_PE	TTTCTTGGGGAAGGTAGTTC
matK41_PE	ATTCAAATCATGGAGGTGC	ycf1seq_PE	CAATATCTATTAGTAAGG	petB_rev_PE	ACTTCGAGGTAGGAAGCCAG
rps7rev_PE	ATACCATATCTTTTGCTGC	ycf1seq2_PE	AAAGACAATATCTTCTTCG	cysA_for_PE	TTTTGGATAGGAGCAATCAG
3'rps12for_PE	GTTAGAGGAACATTAGATGC	ycf1seq3_PE	GCTAAGCGGGAAGGCACTCG	cysA_rev_PE	TTAACTTCTCTCTGCGTGG
rrn45seq_PE	TCCAAGGGTTGGGCTGTTTCG	ycf1seq4_PE	TCAAAGAAGATCCATTATCC	psbD_for_PE	AGAGGCATTATGAGAGACAG
rrn23_PE	CCGAGACAGTGGCCAGATCG	atpH_for_PE	ATCTCTCAATTTTAGTTAG	psbD_rev_PE	ATAAGTCGAGCATTACCTGC
rrn23for_PE	CGTAGCAAGCGACGAAATGC	atpH_rev_PE	AATATTGATATCAGCAAATC	rpoC1rev2_PE	AGTATTAGGTTTAGGTATCG
rrn16_3PE	ATCAGTTTGGGGTTAAATCG	chlN_rev_PE	TTCAGATATTAATCGCTTC	rpoBfor2_PE	AAAGCGAGTGAACGAGCAGC

Name	Sequenz	Name	Sequenz	Name	Sequenz
31C	GCTGAGCACTTTAACTTAGC	psaC_rev_PE	TAAGAAGTTGAGTTAATAGC	rpoBrev3_PE	CAATTAGAAATTAAGTTCC
31D	TTCTAACTAAACCTTATGC	psbI_for_PE	AAAGATCCTGGAGATTATGC	petD2_PE	ACCCCCAAAAGAATCGGACG
rrn16seq_PE	CAATTCATTCTTCCGAACG	ycf12_rev_PE	AATTCGGGAGGGANTGAGAG	rpl16_2PE	ATTGAATGCCCCGAGTAGC
rrn16seq2_PE	TATTAGATTCAAGAATGC	psbH_for_PE	TATAAGTTTTATGGCTACAC	rps3_3PE	TCAGGATTAAGTATAATTCTG
matK42_PE	TTGCTAACTCAATGGTAGAG	psbH_rev_PE	ATAAAAGCAGCAATCAAAG	rpl2rev_PE	AGTCAATTTTTCTATAAAGC
matK5_PE	AAGATTGCTCTCTGACTTG	psbT_for_PE	TTTGATACGAAATCTTCTG	trnV-GAC_3PE	GGGTGCTTTAACCATTACAGC
matK6_PE	ACTCTACTTCTCATCAGAAGC	psbT_rev_PE	AGATTAAATAGCCCAATGAC	psbM_rev_PE	AAGAGTAAAAGGTAAGAAGG
psbG2_PE	GTATTGCCCTTACTGAAGC	trnT-GGU_PE	ACTCTACCACTGAGTTAAGG	petN_for_PE	TATACCTAGTTCTTCAATCG
trnM2_PE	ATTCAAGAACCCAACATGC	psbA6_PE	AACATGGTATGGTATGGTGC	petN_rev_PE	AGAAATTCATGCCCTTTAG
31A	TGAGATTCAAACCTCATACG	clpP2_PE	TTAAGATACATCAATACC	rpoB_for_PE	TCATGACCGAATCGAATAGG
31B	GTCACAAATCTCCATCTCG	clpPrev_PE	CATCCCTTCCATATCTTCG	rpoB_rev_PE	AAGCCAATCCGAAGATGTTG
ndhA_PE	TACTGCAAACCTGATACGCTG	atpAfor_PE	CTGGGCGTGTGGTAAATGC	rpoC1_for_PE	TGCCATTATACCCGAAAAGG
ndhErev_PE	AAAGTCTCATGGAGTTTCG	rps2rev2_PE	CAATTTGGAAAGACAATTGC	rpoC1_rev_PE	ATAAGCATAGATCGGTAACG
psaCfor_PE	TAATACAATGGCACATTCAG	ycf2_PE	ATTGTAATTTCTGCTTCAAGG	rpoC2_for_PE	ATGGGAATGAAACATTAGAG
psbDrev_PE	AAAGCACGGAATGTATTTGC	ndhDrev2_PE	AACGCCATAATTGAGGCTCC	rpoC2_rev_PE	ATTTCAACGAGAATAACGAG
psaBrev2_PE	TACTCTATGGCAAGGAAACG	clpPrev2_PE	CCCTCTCTATATGCCGAAGC	ycf2seq_PE	CTTCTACTAGCTTTTAATGC
ndhG_PE	TAGTTCCGTAGAATGATTCTG	rpoC2rev_PE	ATGAATCCCCAAGGTTACC	ycf2seq2_PE	ACATAAGACTCTAACTAACC
chlLrev	AGATGTTTGGCCTGAAGATG	rpoA_PE	ATTGTTATTCTATTGATTACC	rrn16seq_PE	ACTTCATATTAACCTGAAGC
chlLfor	GCATAATTTAATGGAGCAGC	rps3_PE	TGGTGGAAATGCCCGTGTG	rpoC2for2_PE	CATTATTATTGGATTATTCTG
chlNrev	AAAGTAAATTCACAGACC	cysA_PE	TTTATTAACATGGGGTATGC	rpoC2rev5_PE	GTCTTTTAGAGGCATAATCC
chlNfor	AAACTCTCACTTTTGAATGC	trnP2_PE	ATACCCCATAGTCCGTATCG	rpoC1rev3_PE	AGACCACGAATAACAATATGC
rpl2for	TACCTTTGACCAATATGC	psbE3_PE	TTGATTCCTTCTACTAATAC	petNrev2_PE	ACCATTAAAGCACCCCAAGC
rpl2rev	AACATTTCCAATTTGTCC	atpB_for2_PE	TCTTCCGTATCAAAATGAC	psbM_rev_PE	AAGAGTAAAAGGTAAGAAGG
rpoC1rev	TGAACAGCCATTTGATCTCC	ndhD_for PE	TACGAAATAGGTTCACTCTC	petN_for PE	TATACCTAGTTCTTCAATCG
rpoC1for	ATTAAAGTGGAATTTGTGC	accD_for PE	AAAAGGGGAGCTCTTATGTC	petN_rev_PE	AGAAATTCATGCCCTTTAG
trnV-GAC3_PE	TCATTTATACGCGTCTTCG	accD_rev_PE	AAGATGGTATTGAACAAGTC	rpoB_for PE	TCATGACCGAATCGAATAGG
matK7_PE	ACATTCTCCGTATCAGAAAC	clpP_for PE	ATTCATGGAGATAGATATGC	rpoB_rev PE	AAGCCAATCCGAAGATGTTG
psbAfor_PE	ACGCAGCTTTAGAAAGACG	clpP_rev_PE	TGTATGCAGAATTTGTTTGG	rpoC1_for PE	TGCCATTATACCCGAAAAGG
chlBrev_PE	AAATGAATCTAGTTTGTTCG	petA_for PE	TGTAAATTGAGCAAGTAAGC	rpoC1_rev PE	ATAAGCATAGATCGGTAACG
psbDfor_PE	GGTGCTCAGTTGCTCATGC	petA_rev PE	TTGGTACACTTCCGGATTAG	rpoC2_for PE	ATGGGAATGAAACATTAGAG
ndhDfor_PE	GGACTATTTTATTAACAGG	petL_for PE	TTTAATTGTGTACATATCG	rpoC2_rev PE	ATTTCAACGAGAATAACGAG
ndhDrev_PE	TTATTCATCAATAAACATTTG	petG_rev PE	TGATAAAGGTTTATCATGG	rps2_for PE	TCGTCAAATTACGAAGAAAC
ndhHfor_PE	TCCTATCATCCATCAATGC	psal_for PE	ATTAAATCATACGAGGTAG	rps2_rev PE	TTAATCGATTCTACCGTTAC
ndhHrev_PE	AAATAACGAGCTAATGAATC	psal_rev PE	ACATCGTCATCGCCTTCTC	ycf2_mrev1_PE	ACAACCTTGACTTAGGAATG
psbT_PE	TAAGCCCAACGACTCTCTGG	psaj_for PE	TGAAATACGAATATACGGAG	ycf2_mrev2_PE	TGTTTTTCGTCTGCTCTTCG
petB_PE	CTCTAAACGCTCTTCGAACC	psaj_rev PE	AGAATTCATCTCGTCGATTG	ycf2_mrev3_PE	AAAGGAACATGAGAATCTGC
psbH_PE	TCATCCGCTTATTAGATGG	psbE_for PE	TTGAAGGAATGATATTCTGC	rpoC2_mfor1_PE	TGGAAGGAGAAATGCATTGG
psbH2_PE	TGAGATTATTAACTTTGTG	psbJ_rev PE	TCCAATAGGGTAAAGAATCC	lRout_PE	AATTTATGTGCGGTCACTGCG
clpP_PE	ACTCTATCGGGAAGACTGC	rbcl_for PE	AGACCTCATCCTTGCTAGAG	ndhFfor_PE	CCTGCTCCGTTAACAATTCC
rbclfor_PE	GAAGCTTGTGTGCAAGCAG	rbcl_rev PE	TGATCCACTGAGCTACCAGC	ndhFrev_PE	AACGACGGCCAGTGAATTCG
psbE_PE	ACAAGGTTCTTTCGGTCCAG	rpl20_for PE	ATTTTAAGTGTAGAGTATG	ndhFrev2_PE	CCAGCGCAGCTGATGCTTGC
petBfor PE	GTAACCGGTGTACCCGAAGC	rpl20_rev PE	ATTTCTTCTCATCGGAACC	ndhFfor2_PE	TAACGATGGGCAACATTTCTG
chlNrev2_PE	AAAATCATAACTCAAGAGC	rpl33_for PE	TTTTTGACTAACCCAGAACC	orf288rev_PE	GTCAACCTCCTACTGAAGC
chlNfor2_PE	TAATCAAATACAACGTATGC	rps18_rev PE	ATTTGCTACGGGAAGGTTCC	orf288for_PE	TAGTAGTCAACTTCGCTACG
atpAfor	TTAGTGGAAGGAAGTATGAC	ycf4_for PE	TTCTAGGAGAGTCTGCCTTG	rpl23rev_PE	TCTCTCCATATACTTCTACG
atpArev	TGTGCAAAGGCTTCTAATTC	ycf10_rev PE	ATATGCCCGTTGTACTAACG	orf288for2_PE	GCAGCAACAATTATAAATGC
rpoBfor	CAAGATCAATTAATAATAGC	chlN_for2 PE	TATATGGAAGAGACAGAAAC	ndhFfor3_PE	TAGAAGTCAATGGATCAAGC
rpoBrev	TTATTTCCATGTCTTCCAGC	ycf1_1_rev_PE	ATTGAATATTTGTTTTGCAC	ndhFrev3_PE	GCAGGTAATTTACCTTGTTCG
ndhDfor2_PE	ACTTTATCCAGTTGGCTGC	ycf1_2_for PE	AATGTCTCAAGCATATGTAC	lRout2_PE	GTAACAAGTCAAGCGAGAGC
ndhHrev2_PE	CTAAACTGTCAATATATCG	rpoA2_PE	AAGGAAAGTAATCCGTATCG	ndhFrev4_PE	ACAAAAATTAGTAAACTTCC
ndhHrev3_PE	AGATATTGGACGATTGTTCTG	rps3_2PE	ACTATATACGGAGTATTAGG	ndhFfor4_PE	GCGAATTAGAACATAATACG
ndhDfor3_PE	TAGGAATAGTCAATAATACG	rpoC2rev21_PE	TTTTGGTGTTTAATCGTTCC	lRout3_PE	TCCTTGAGTGAAATAGCACG
ndhB-for2_PE	TACTTCATCCTATCTCTGG	ycf2_2PE	AAAATCATATTGAATCAGAG	orf288for3_PE	CGAGGCGCTACTATCATTGC
psbA_rev_PE	CAACCGTTTGACGACGAGGAGC	cysA2_PE	CCCAACGAAATAATTAATCG	ndhDfor4_PE	CTGTCAATTTTCTATTG
chlB_for PE	TTAGCTTATTGGATGTATGC	rpoArev_PE	AAGGGTGAAATAGCAAATCG	ndhB_for3_PE	TACTTACTGGTTCTAATAGC
chlB_rev PE	GCACTTGATGCTTCTTAGC	rpl16_PE	TTTCGCACGATTCTCAGCAG	accD_revseq_PE	TATCTTCATCCATAGGATGC
psbK_for PE	GAATCAAAATCTTAACTATG	rpoC2rev3_PE	AAAGGTTGTCTATTATCTCG	atpE_rev3_PE	CAATGGCATCTAATACATTC
psbK_rev PE	TTTATTAACCAAAATTTATCG	ycf2_31PE	ATTTGAGTGTGATATTTCG	ndhI_rev3_PE	TATGTTAATTAACCGAATCG

Name	Sequenz	Name	Sequenz	Name	Sequenz
matK_for_PE	TTTTTCCACTATTAAGAAGC	ycf2_4PE	CCGTAGAAGCCGGCGTTCG	ndhI_for2_PE	TTCAACGAAGAGCAACAACG
matK_rev_PE	CATTACTTTGGAAATCGTAC	ycf2_6PE	AAACCAAACCTTTATCCACG	rpoA_for2_PE	GATCAATTAGAATTACCTGC
ndhE_for_PE	CTCCATGAGGACTTTATATG	ycf2_7PE	CTCTATGTTACTACGGAGC	sz2_for_PE	GGTACACTACCAAACTGTGC
ndhE_rev_PE	AAAAATCATTACCATTTTAGC	ycf2_5PE	GATCTCAATTTCATTCTGG	rpoB_for2_PE	GGATTCCAATATATACTGG
ndhG_for_PE	ATTACCCGAATCATTCTACG	ycf2_32PE	CAATCACAACATTAATATGC	rpoB_for3_PE	GCAAGATCAGTTGAAATTGG
ndhG_rev_PE	AATATATCTTCTCCATGTC	psbB_for_PE	AACATTATAGTAGCTGTTTC	rpoB_for4_PE	GCTTCACTAGCTTTCATGC
ndhI_for_PE	TTCTACATGTTTTCCACGG	psbB_rev_PE	TTACAGAAGAATTCGTATC	rpoB_rev4_PE	GCGTAAGGACCGCTAGAACG
ndhI_rev_PE	TCAAATTAGAATGTCCTTCC	atpB_rev2_PE	TTCCAACAATTCGATTAGG	ycf_12PE_rev	GCAAAGATTCGGTTCGTGCAT
clpPfor_PE	TCGTATTATGATGGTCAAGC	ndhK_for2_PE	TTTATTCCGGGATAAGGATCG	ycf2_5for_PE	ATGCAGAACGGAATCTTTGC
psbE2_PE	ATTGGTTCACGAAGATACG	ndhK_rev2_PE	TTACTCCCAAAGTATTAGG	cysA_for_jk	CCAAGTCATTAGGTAATTCTG
psbJ2_PE	GTTTTAGTATACGACTATTCT	rps4_for2_PE	TTACTCAGCAGTATAACACC	cysA_int_2_jk	CGTTATTACAAGATAATGA
rbclfor2_PE	ATTGAACTCCTAATGATCG	psaB_for2_PE	TAGGATAATGGCTAAGGAGG	cysA_int1_jk	GCCATTGAAACTGCTCTCC
psbCfor_PE	GTTTGGTTCACATAACACAGC	psaB_rev2_PE	TTGAATCTAATACGTAAGAG	cysA_rev_jk	TTAACATGGGGTATGCTCGC
psbI3_PE	ATTACAATGATCTGACTGTC	psaA_for2_PE	TTGGTGGGTTTTTCTATGC	ccsA_for_PE	GGTATCTTTCAACTTTTATC
atpAfor_PE	ATTACGTCCAATAGGATTCTG	psaA_rev2_PE	AACCTTGGAAATCTTGATGC	ccsA_for1_PE	GCTATGGATGGATCTTTCTA
atpArev_PE	ATTGGTTCATAAACGGAACG	ndhB_rev2_PE	ATTATGAATAATGAGTGTGC	ccsA_rev1_PE	GCATCATTAACCAATGAGAT
ycf1rev_PE	ATCTTTAGCATCGAAAATCG	ndhH_for2_PE	ATCTAACCAATTAAGGAG	ccsA_for2	CGGCTATTATTGCTTCTCTA
ycf1for_PE	ACATCGTTGCAAGATACTCG	ndhH_rev2_PE	TAAAGTTGGACAAATTATCC	ccsA_for	GCCATTTATAACCTTAGAGC
petArev_PE	TATCCACCTTTTCTCGACG	psaA_midfor_PE	TCTATTCTCGTAGCTGGTC	ccsA_int2	CCAGCTTTACAATCTCATTGG
accDfor_PE	TAAAGCTTATATTGCATTCTG	psaB_midfor_PE	TGGGTTCATTATGACAGGTG	ccsA_int1	GTTATTGCTAATAAGATCCGC
atpA5'_PE	TTTATTCTAATATCTGCTGC	psbB_midfor_PE	TTATCTAGTAGTATTGCTGC	ccsA_rev	CCATCCATAGCTATGTAAACC
rps2for_PE	AAATTAACCTCAGCAATTCTG	psbB_midrev_PE	AATTTTGGACCAAGCTTCAG	rpl16_rev2	CGAGCCCGCTATTATCTGC
ycf1for2_PE	AATTCTTAACATCATGTAGAG	cemA_for_PE	ATGACAAAAATACATGCTG	rpl16_for2	GCTACTCGGGCAATTCAAT
ycf1rev2_PE	ATAGTTTTCTATGCTGATGC	ycf4_rev_PE	TTTGCCGAAAAACAGCATG	rpl22_for2	GCTCAAGGGCGTGTTATCC
atpAfor2_PE	AAACCAATGATTCAGTTACG	chlL_for2_PE	TGGAAGAGACAGAAACATAC	rpl22_rev	CGAACCAATACGAACGATGG
atpB_for2_PE	GATACAATAGAATAGAAAGG	chlL_rev2_PE	TTGCGATTCAAAAGTGAGAG	rpl2for2_PE	ATAGCAGGTAGTGAGATTCC
clpPfor2_PE	GAAGTATTGATCATAATTACG	chlN_for2_PE	TTGAATCCGGTAAACACTGC	rpl2_for3	GGAAATAGTTAAATCCAAACC
atpFfor_PE	ATAGTCTCTTTATAAATTGC	chlN_rev2_PE	TTGAGATTAATATCGCTTC	rpl2_rev3	CGCTTCAATAAAATTATTACC
atpIfor_PE	GCTTTACCTACATCAGTAGC	ycf1_for2_PE	TTGAAGCGATTTAATATCTG	orf288for4_PE	GAGAAGGGGTGGATAAAACCC
petDint_PE	TTTTCCCTGTAAACTATCG	ycf1_rev2_PE	ACGATATACTCACAAAAGAG	ndhDfor5_PE	GGGATGAGTGGTTTCGTACGGC
chlLfor_PE	GCTACTTCTCAGATCCAACC	rps12_for_PE	AACAAATTCTGCATACAATC	ccsA_for2_PE	TTTATAATAGGAACGGTAGCC
psbHseq_PE	ACCTCCAGGTCCCGTCATCG	rps12_rev_PE	ACTTTTACGTGACATGATAC	orf288_for_PE	ATATCTCCACAATGGGAC
trnP_PE	GACAGTTGGGGTACGATACG	ycf2_8PE	ATAGTGTATATAAGATTTAGC	orf288_rev_PE	AGTCCCACTACTCCGAGAAG
petArev2_PE	TTACTTGCTCAATTTACAGC	ycf2_9_PE	TGAATGGTGGGAGTATTATC	rpl32_for_PE	TATTTGAGGACGAGCAACAG
accDfor2_PE	CTATCAAGAGATATAAATCC	ycf2_10PE	TGGGGAGATGGTTAATCAGC	rpl32_rev_PE	TTTTGTCCCCATTGTGGAAG
ycf1for3_PE	ATTTACAATAGATAGATGG	ycf2_11PE	ATGAAATTAGCTTTTCATCG	rpl21_for_PE	TTTATTGAAGTAAAGCTGC
ycf1rev3_PE	CTATATTTACTCTAAATTC	3'rps12for2_PE	GCTGCGATGAAGATTGCTGC	rpl21_rev_PE	TTTTTCTGTTGCTCGCTCTC
rps2rev_PE	TGTTTCCCTTACTCGCAGC	rpoC2rev6_PE	AATTCTAACCAACCCACTCG	ndhF_for_PE	ACTCAGATATGATTGAAGCG
atpA_for_PE	TCATCAGTTTCATCTTCAG	atpE_for2_PE	AATATCGATGAAGTTACTGC	ndhF_rev_PE	TTATGTGGTCACTCGCTC
atpA_rev_PE	TTAGTAATAAATCCGTGATC	atpE_rev2_PE	TGGTTCAAGTCCAATAGTAG	ndhD_rev_PE	CCAAATAGAAAATATGACAG
psbC_for_PE	CTATTGAATGAAGGTATTCTG	ndhG_for2_PE	ACTCTGTCAATATTTCTGTG	ndhD_for_PE	ATAGGTTTACTCTCATTGTG
psbC_rev_PE	GTTTCTATTTTCGATCTCTC	ndhG_rev2_PE	ACAAATGAAGATATCCAAC	PE_ndh5_1	GAAGCTATAACAATGGACGG
ycf9_for_PE	TGGAGAATTACAACATGAC	ndhI_rev2_PE	TCACGAAATATTGACAAGAG	PE_ndh5_2	CTGGCATATATTTTCGTAAACC
ycf9_rev_PE	AAAGAATTAAGAATACCCAC	psbA_for_PE	TAACAAGTTAATCCGCTTGG	PE_ndh5_3	TAAGTAGGAACACATTCCAACC
rpl20for_PE	AAAGATGCTTGCTCAAAATCG	psbA_rev2_PE	AGTCTTGAAGTCAATTATTC	PE_orf288_1	GGTGAAATGGTAGACACGCTG
rps18for_PE	CAACGTTTATTGACTATAGC	psbM2_PE	CCTTAGATTTAGGGAACCTC	PE_orf288_2	CGCTACTTTTATCTATTGGGG
ycf10rev_PE	TTGCAATTGTATTTCAACG	trnC-GCA_PE	TTTGAATGTACCTATCACG	PE_orf288_3	GGAGTTAATCTGTTGGCGAGAGG
ycf4for_PE	CAAGATGTTCTCTGAGTCG	rpoB2_PE	ACCCATTAAGGCTCGATTCTG	ORF288 seq	CCATAGCGGCTAACTAATA
ycf1for4_PE	GTTACTGATCATACAGTCAC	rpoB3_PE	ATTTTAGCAGATGGCTCAGC		

9.2 Minicircles aus *A. carterae*

Name	Sequenz
AC T1	<p>AACACTAGGTTACGAATGAGCGGTTGAAATGCCCTCTGAAGCTGGAATCGTTAGTAACCTACGGTTAGTTATACTAGGGTGAATAAGAGATAAGTTGCATTC ATACTGCCCGTCAAGCAAGTAAAGGACCCTGGGAATATAGGCCTTCGATGGTCTCCCGTAAGGTCGGATAAGTGTTAAGTCGAAACATGGTAGGTTAAACGGAAG TTGAACCTGGTAAAGGAGGGGAAGTTCCCGATTAAACAAAGGTTAAGGAAACGTACGAAGGATAACGAAGGGTATGGATCTCTCCTCAACATCTCAGGACAAATCT TATCAGATGAACGACATCCTGGGTAATCTTAAACTACCCGACAATCGTTTCCATAAAGACACCAGCTTCAAAAAATGCCGGTCAATCCATAGGAGTGAGAAAAATCA CAGACGAGAACGAAGACAGAATGACGGGAGAAAGAACGATTAGTAGAGTTAAGACGTGGATCTGGCAGTTTACACAAGGCACAAAGGCTCCAACGAGCAGC TAGGATAAGAATTCAGGACTGTAATANAGTTAGTTATGTCTTATACCGACAGGGTATAGGTTTGAATCCTATGTCCGCTTNTATATATTTATACNTNGGGCTAT CGNCGGGAANGCAACGCTCATGAGGACTAATGGACGCTGTTCCCTGTAATAGTGAGTAATGCGATCCATAAAGAAATGAAAAAGATAAGTCGCGTATACCTCT CTGAAGGGGAACGACGTCAGTACAATCAACATGGTTCGTCTTATTAGGCACTACCAATGGTTGCAATGATGGGTACTTAGGCTTAACGGCTCATAGACGCTGG ATCTGAAATACGACCAGGACCATAGTGGGATGATGGGTAATATCCGCAATCTACTAATGTCTTCGACGGTGAGACGGAGTTACATCAGCTGTGGGAAGA TGCTATGACACTCTCCACCCGCTAGTCACGATACAGATGTGCCAGCAGTCGCGGTAATACATCTGTGGCAAGCGTTGTGAACGTTATTCGATGTAAAGCAGCG TTAGGCATCAATCCTAATATCTCTACGAGACCTTCATGGGCTCTCAAGGGAAGCTGAAAGCTGAAGTGAGTTAATAAAGACATGAGAAGGTGCATATGAAGC CTGTGGGTAATATAGTGATTAAACGGTCAAAATGTAGGAACCTGTAAGTGCAATCCACAGTGGAAGGTGCGTGACCTTAGTTGGTCCCTGGCGTAGCGATAAT GCAAAATCCCTATTCAATTAGGTTAAGTAGGTCTTAGCGGCTTANCGGGCTGAAGGTATCACTGATCAANGCATGCGTGATCTNGTNCANATCATGAATANACA GNCGGTGATGTCTCGATCCCTGGCAATGTCTCAAGGTGGGTTAAGCGATCATNCCATGGATANTATGATGAGCTGCCCTTTCGGTGCCCTCCGCTACCCCTCATG GGCAGCTGANTCAATCTGGTTCCTCAGTCTGTGTTAAGACAAACGACGATCTCTTATCCCTGCAACGGTCTACCTTAATCAGGTGGTACTATGGTGACAGTGTG TGANTCTAAGCTACTCAGGTGTGATCCCTGNATATTCANACGGGTATCTNATNACNCGNNGATNGTGATCATTANTGGTTACCTCATAAAGACNNTN GCGTTTAAAGGTAGTGATAGCTAGCAATCANTANTCTATTACGCTATGTGTGGTGATCAAGGACCGTGCGCTACCGACAGGTACTCGGTGCCCTCGGTATAAT GGTACCACTGCGTACCTTGGATCACGAACCTGATTTCTTCTCTAGAGTACATTTGATGCTGTTTACCAGTTTCTATCATCTAAGACCTTCACGTCATTACCTTAT CACGGTATTAGGTCTACACCTTAGACTCTCTTGGACTTCGATCCTCTTAAACCAATAGTACTGTTCTTTGAAATGTACGCCATAGGAATGCGAAAGGTAACG GTGGAATGTGGTAGAATCACTTGGGACTTCTCTCGGGGCTCTCAGGCCAGTCTGAACCTGTGGTAGCAAGCTGGATAGATACCGAATGATGCACAGAG GTTAACCTGGCTAATCGTAGACTGGATAACAAAGCTTAAGATTAATTAGGCTCATTTACGAGTACGCCGTCGGGGTGAACCTTAAAGGTGCTGGTGGTAATTT AGAACACGGTGGAACCTGATGATTAAATTCGATGTTACGCGATACAGCTCATCCAGATCCCTCTACAGCCTCGTAAGAGGTTCTTCTGCTATACGGTAAGGT GTGTCATGGCTGTCTAAGGTGATGTCTCAGACATAATCACCAACCCCTAATCTTCTTCTTATTGGAGGAGGTTGATCAAGGTCAAGTCATTATGGCCCA TGCGTGGAGCGATCCATCAGTTACAATACCTGGTTCATTCTCCGCTGACAGGCGGTCTCTG</p>
AC T3	<p>TTCTGGGACCTTCATGAACGATTAGGCTTCTGAACGACTCGTTAGAATCGATGTAATATTATTAAGAACAACTAGATCTCTTCTCCTCATGGATATGAGAAT CGAAGAATGGTATTAAACCATATCGAGATCGAGTAATAATGAATACGTAATCAGTAATAATGCACGACTAGAATCTTTGAACGATGAATGCCCTTCTACCT AAGTAGAGATCGTTGTGGCGACGATCAACACACGGGTAACACAGTACTCTTAGATGCTATAATGGGCTCGTAAAGGCTCGAGATCCCCGCTGTAGTACTCT GGATTGGACGATTACGACCCCTTCTTTAACAGCTCTTCGGAGCGAAACACCTTATTGTGCAATGTGGTCAATGGCATAGTTGTATGCTTCGGACACTTACCGC GAGTCTTACGCGTATCTAAGCAGGTAAGCTGGTGGATCCCAATCCTCTTGCATGTTGAATCCTTACTGTTCTGATGGGGCAGGAGTGTCTTTCTTTTCTT GGTCAACTTATCTGCACTGAATTAACCCAGGTTAATCTTCTGAGTAGAACGACATCTGGGTAATCTTAACTACCCGACAACTGTTTCAATAAAGACACACG TTCAAAAAATGCCGGTCAATCCATAGGAGTGAGAAAAATCAGACGAGAGAGAACGACATGAACGAGGTGAAAGGTAGGAACGACTACGATTATGATGAAA CGCAATGAAGACCTCATAGGAGGGGAATTGATAAAGATGAACATATCTCGGGGATGCGCTAGGTTGGGCTAAGAAAGCATCAAAACAGATATCAACCGCT AGAGTAGGTTACAGTGATTACTCTGATCAAGGATGATTACTACCTGCGGAAAGGTGGTTACAATACCTCATACCTGTATGACTGATCGGTGCTTAAATCACAC CTTGCAAGTTGCCAATTACATTGAGTAGGCATTTAAACCAATCTTCAGGGTTTACACCGCAGTCTAAGGTAGAAAGGTCCAACATCAGGTCAATCAGGTATG TGGCCAGAAACACGCTGGAACCTGAGACCTACCTCCCTCGGGATCCTATCAAATGGTCTGTGATTAGTCCCGCTTACGGAGTGCTTGTGGCGGTGG AGTGGCAGGGGGGGCAAGTAGTCGAGTGGTGAAGTGTGATTCGGGTTCTGATACTTCGGTATGTAAGAGAGATGAACCTCGTGTAGTGAGGGCAG CGTAACTTTTCCATATCTATTATGACAAGCCTTATCGCTCTAATCTCGGGGTTCTTCTGTTCAAAACATCACTTCTTCAACGCTTATCTCGTGGTGGTTC GGTCTCTCGTATTTCCACTTCTCTCCAGTACCGTAGCTTATATCACTGCTTCTCTCTGCTCTGCTGCTGATATTGATGGTATCCGTGAGCCAGTGCAGGTT CCCTTATCTATGGAACCAACATCATCTCTGGTCTGTTATTCCTTCTCTAACGCAATCGGTGCCATTCTATCTCTCTGGGAATCCCTGGTCTGATGAATGGCT CTACAACGGTGGTACTTATCAGTTCCGTTGTGCCACTTCTCTCGGTGGTCTGCGGTTGGATGGGTCCGTGAATTGGGAATTTCTATCTGCTAGGTATGGCTCT CGGTTCTTCGANNATCCCGNATCCCAATNGCGCAGCAGCTGCAGNCTCCANATTNACCAATCGGNCAGGGTCTCTTCTCCGATGGTATGCCANTNGNAT CCANGTNTCTTCAACTCATGCTGGTCTNCAAGCTGANCAAGATCCTCATGCTCCTTCCANATCCTGGGTGANNAGGTGTCTTGGTGGTNTCTCTNCT TCCGCAANGCAGGGTTCTCTNGTATCCTCTCTCTCTGTCANAGACTGNTGGTNTGANTCCCTTAAACAGGTTACNTATTCGNTCAAGAGGATGANACTTAT CCATCTCTGAGCNCACGCATATTTCGGTCTGCTNATCTTCCANTAGCTCTTCAACAANTCCGCTNCTTNNANTTCTTCTGACGCTTGGCTGNAATGGNT ATCNGNTTCACTCTCTNNGTGTNGCTACTATGGNNTTCAACCTTAAACGTTTCACTTCAACAGTCTATTCTTGACGAATCTGGTCACTACATTAACCTTGGG TGATATCTCAACCGTCTGATCTTGATCGAGGTAATGCACGAGCGTAACGCTCATAACTTCCCTCTGATCTTGATAGAATCAACCCCTTTCCC</p>
AC T4	<p>GCCTATACGATTGACATTTAGCCACCAACCCAGATCCAGTGACCAAGTTTGAATAACTCCTCATCGGCTTGAACCTATAAAGAGTGACGCTTTCCAGGGT TAGATCATAGGCATTCGGACTCAGGACAGACCAGTCTATCTTCTGATTGTTCTCGCTTCTTCCACAAGCAGTGCTCGTTAGATTAAAGCAGAATTTGTGCAAG TTCTATTACTCCCTTCTCAGGGTCTTTGCAATTATTGGCTCAGGCTGGGTATGTTTAAACAGTACTCATCACTCATGTGGTATTGAAGTACGGGTGACGGCCTCACC GGCTTTGTGCTACTGTTTACCCCTCTTAAAGAGGTTATCGTTCGGAGGGGATAGGAGAAGTGCCTAATGGCTGTTTTCGGTGGTAGCGCGCTCTTTATCAAGT TGTTTCTATCTATAAGGTGCGTTTCTACATTTATCTCGTTCTGCTCTGCTCTGCTGCTGATTTTCACTCTATGGAATTGACCGGCAATTTTGAAGCTGG TGCTTTATGGAACGATTGACCCGAGTTAAGATTACCCAGGATGCTGTTATCTGATAAGATTGCTCTTATTTGTAAGGAGAGATCCATACGATCCATACC CTTCGTTATCCTGTCGATGTTTCTTAACTTGTATTGTCTTGATACACCTTGTGTTGATTACTTTGACCATTTGCCAGACCTATGACCAAGCCACCCAGTGGGT ATGCGTCCAGAGGCTTACTTTCACTTATCTTGAACAGTGATAACCCGTTAATGAGGCTGTTATTGGGGAGCTAGCTATGATCTGCGTATCGATAGATACCG TGACCCAGCTGTATATGCAATAAATGGCAGGAATAGATATAGACCAACTGATTTACATGTTCTGAACCCAGCTCGTGACTTGAATGGAGTGAGCACCTC CACCTTGAGCCTTGTGCTCTCATGGAAGGTAAGCCGACATCGAGGTGCCAAGCAGGGAAGTCGATAAGAACTCTGTTCCCATTAAGCCTGTTATCCCTTGG GTAACCTTTATCCTTTAAGTTGCTTTCAAGATCAGTAAGACAGCTATTGTGCTAGATTGAATAACTTCTAGCTCAGGATTGGTCTACCTTTCTACGTGTAGTAC CGCTTTTATGACGGGTTTGCATCCTTTGGTTAACTCTCGTTGAGTAAAGAGGTCGCTGCCCCAATCAAAACCGTCAACGGAACCTCACCTGTATTGAATGGTAA AGTGATGCTGATGGAACAGAGGTATACMACCGTAGCCGAAACAGATCACAGTACCGCTAGTTTGGTATAAAGCTCCTGAGGGTCTTCTGTCATGTTCCCAA CGAACGCACTTTCAGCTCCAGTGTCATTACCATTAACCTTGGCTAAGACACCCATCTAGTCTGTTCTATGTTTATGACGGTCAGTATTTAGTGACAAGGAATTT CGCTACCTTTGGACGGTTACAGTTACCGCCGATGTTTACTCTATTGAAGCACTGATACATGTCGCGCAGAGCCAAAGATCGCTGAACCTCACCTGTGTTTGT TTAAACAGTCGCTTGTGATGAACAGGATTATATCCCTAGGTTTCAACTCGGTTGTCAAATTCATTACGCCAGTTAGCCATGTACGTTTCTATTATGAGCCAGCCTG TGTTAGAAGACAACAGTGCCTATGTGCCAAGGAGGCAAGGCACTACTGGACCAATACCCGAAGGTAGAAAGTGTATGGAGTACAGGAATCATACGTTAGGGGCC TTCGTTACCATGTATTACAAGGAAGTTAGCGTTGCATCCCTATTCTGTCGACAGCGGAATAACCAAGGTGGAATTAACGCGGCTCTTCTGTTGACCTGAGC TACTCAAGAGACAGTATCAATACCTTCAATNCCGAAGGAAGGTACGCGCTTACCAAGGTGGCGTACGTCGNGTACCTGAGATCAGGATCAGGATGAGTATAC CGCGGTGTAACCTTATAAGTTGGTGACACTCGTAAGAAGATGCATCTGCTAATGCGACTTGAAGGTGTGATTAAAGCAGCCGACGCGAGCTAAGCACTCAAT GCGTATGGAACGCTTAGTACAGCTAGGGGTTGTGCCCTTCTGTAGATAAGTTATACCATCCTAACCGAATAGAGACACTACCTGGAACCTTCATGACGCA GCCATTGAATGAACATTGTGCGATACCAAGTTGTTATGTGGGCACTCGTTAGCCCTAATCAAAAGGGGAAGTTAGAGATGGAATCAGGCTAACGCTTGTGTTT ACGAAGTCAAGATAAACCCTGCAAGGTTCAATGGACACCGAAGACTTAACGGTGAACCTTCTTCACTGACGCGCAGTGAGTGTGTTTACCTTCGGACAATTA GCCCTACTTAACCATTCGACGCCGTAGACTGAATGGAAGTTACTGATCAGGGTACCTTATTAGGCCACACCGACTTCTACCTAATGGAATGCACTTACAGGTCC TACAATTTGACCGTTAATACATTATGTTGCCACCGGTATCTACGCACCTTCTAAGGAGGAAGCGGTTCTACTTCTGTCTATTGCTATAGATCTTGAACGCAAC CAGATATTA</p>

Name	Sequenz
AC T5	<p>TTAAAGCACCGGACGGCAGTTAAGCACTCAATGCGTATGGAACGCTTAGTACAGCTTAGGGNTTGTGCCCTCTGTAGATAAGTTATACCCATCTAACCGA ATTAGAGACACTACCTGGAACTTTCATGACGCGAGCCATTGAATGAACATTGTCGATACCACTGTTATGTGGCGACTCGTAGGCCCTAATCAAAGGGGAAGTTA GAGATGGAAGTCCGACTAACGTTTCTGTTTTCACGAAGTCCAAGATAACCTCGAAGGTTCAAATGGACACCGAAGACTTAACGGTGAACCTTCTTTCAGTGC AGCGCAGTGAGTCTTTTACCTTCGGACAAATTAAGCCCTACTTAACCATTCGCGAGCCCGTAGACTGAATGGAGTTTACTGATCAGGGTACCTTATAGGCCACAC GACCTTCTACCTAATGAATGCATTACAGGTTCTACAATTTGACCGTTAATACATTATGTTGCCACCGGTATCTACGCACCTTCTAAAGGAGGAAGCGGTTCTA CTTCTGTCTATTGCTATAGATCTTTCGAACGCAACAGATATTAGCCTATACGATTGACATTTAGCCACCAACCCAGATCCAGTGACAGTTTGAATAACTCTCA CATCGGCTTGAAACTATAAAGAGTGCAGCCTTTCCAGGGTTAGATCATAGGCATTGCGACTCAGGACAGACCAGTCTCCACTAGTCTATCTTCTGATTGTTC TCGCTTTCTCCACAAGCAGTGCTCGTTAGATTAAGCAGAATTGTTGCAAGTTCTATTTCACTCCCTCTCAGGGTTCTTGTGATTATTTGGCTCAGCGCTGGGTATGT TTAACAGTACTCATCTCATGTGGTATGAAGTACGCGTGACGGCCTCACCGGCTTGTGTCACTGTTTCACTCTTACTAAAAGGTATTCGTTTCGGAGGGGATAG GAGAAGTGCCTAATGGCTGTTTTCGCGTGGTAGCGCGCTCCTTTATCAAGTTGTTTCAATATCTATAAGTGTGTTTCTACATTTATCTTCTGTTATGCTCTGTTCTC TCGTCTGTGATTTTCTCACTCCTATGATTGACCGCATTTTTTGAAGTGTGGTCTTTATGGAACGATTGACCCGGAGTTTAAAGATTACCCAGGATGTCTTCAT CTGATAAAGATTGTCTCTATTGTTGAAGGAGAGATCCATACCTTCGTATCTCTGACGTTTCCCTAACCTTTGATTGTCTTGATACACCTTGTGTTGATTACCTT TGACCATTTGTTCCAGCACCTATGACCAGCCACCCAGTCGGGTATGACGCGGAGAGCCTTACTTCACTTATCTTCGAACAGTGATAACCGTGTAACTAGGCGTTATT GGGGAGCTAGCTATGTATCGGTCTTTCGCTACTAGATACCGTGACCCGAGCTGTATATGCCAATAAATGGCAGGAATAGATATAGACCAAACTGATTACATCGTT CTGAACCCAGCTCGTGTACCTTAGAATGGAGTGAGCACCTCCACCTTGAGCCTGTGCTCTCATGGAAGGTAAGCCGACATCGAGGTGCCAAGACGGGAAG TCGATAAAGAACTCTGTTCCATTAAAGCTGTTATCCCTGGGTAACTTTATCTTTAAGTTGCTTCAAGATCAGTAAGACAGCTATTGTGCTCAGATTGAATAAC TTTAGCTCTCAGGATTGTTTCTACCTTTCTACGTGTAGTACCGCTTTCATGACGGGTTGCCATCCTTGTAACTCTCTGTTGAGTAAAGAAGGTGATCGCCCCA TCAAGCCGTTCAACGGAACTCACCTGATTGAATGGTAAAGTGATGTCGCTGATGGAACAGGATATACCCGAGTTCAGCCGAGTTTAAAGATTACCCAGGATGTTG CGTATAAAGCTCCTGAGGGTCTTCTGTCTGTTCCCAACGAACGCATCTTCAGCTCAGTGTCATTTACCAATTAACCTTGCCTAAGACACCCATCTAGTCTGTTCTA TGTTTCATGACAGTCACTATTAGCTGACAAGGAATTCGCTACCTTTGACCGGTTACAGTTACCGCCGATGTTTACTCTATTGAAGCACTGATCAGATGTCGGCGC AGAGCCAAAGATCGCTGAACCTACACCTGTGTTTTTGAACAGTGCCTTGATGAACACGATTATTATCCCTAGGTTTCATAACTCGGTTGTCAAATTCATTACCG CAGTTAGCCATGTACGTTTATTATTGAGCCAGCCTGTGTTAGAAGACAACAGTGCCTATGTGCCAGAAGGCAAGGCAGTACTTGGACCAATTACCCGAAGGTA GAAAGTGATGGAAGTCAGGAATCATACTGAGGGCCCTCGTTACCATGATTATCAAGGAAGTTAGGCGTTGCATCCCTATTATGTGCGGACAGCGGAATAACC AAGGTGATTAAACGCGGGTCTTCTGTTGAACCTGACCTAATCAAGAACGATCTACTAMCCTTCTATCMCGAAGGAAGAGTGACGGSGTTCTACCAAGCT GGCGTAGCTCGGGTANGCATTNANTGAGNATGTAGAGTACNCGCGGTGAACNTNATAAGNTGGTGGACAGNCCGTAAAGGATGACCA</p>
AC T6	<p>CTGATAAGATTGTCTAGGATGTTGAAGGAGAGATCCATACCTTCGTTATCTCTGACGTTTCTTAACTTTGATTGTCTCTTCTTTATTTAATTAGGTTAGTT GTTAGTCTTTAGACAARTGGATTCTTACGGAGTCTCACGAAGTACAACGCATAGAACCAAGTACCACAAGTGAAGGAGAAGTAGGGCAATATAGAAGAGCGAC TCCAGCTATAGGTTTNTAACCACCTACTGATCGCGGTGCTGACACTAATGAGACCCATGTAGGTACCAAAGAAAGCCTTTCCACATCTTAAATGCGTGCCACCG CCTTGTGTTCTTACCGTAACCAATTTCCACACCTATGCCTCGCAACGAGGCAAGACCAACGCACGGAGCTCTAGCTTAACACCCAGCACCTGTTGCGARCGC TTCAATGTACCCATGACGGAAGTGAACACAATGTTGATTACAGCCGCTCTCAATGGAACGATACCAAGGAGTTGGACAGCAGGGCCGATGATTCAATGCTATT ACCTGCACCACTTAAAGCGAGGGTGGGATTAAAGGGAAGCAAGCCTGACGAGACCGTACTTAGGCTTACGGAGGAGGAACTGGAAGACGACACAAGGACTG TGCCCGGTTGAGTGTATGAGATCGGCGAGSCCAGAGAGTTAACATAACGCNWSAAAGAGTGCTTCGAAGATACGAACGCAGCAACATACCTTTGACTAACTGT TTACCTTTCTTANTAACTCAGGTTTGATTACCAATTTGACTACAGTTCCAGATTCTTACATATTACGACCTTGATCACTCCGCTCAATTAAGCTGAATCATGT TAAATGCTTGTACACAGGTCTCGATAAGTTGTATAACCTTCCAAATTTTGTGCGTAAAGGGGTGTCAACACAGAAATTCATGATCCATAGAAGGATACGGGATTG TGTTCTCAGAGATACCTTAGAGACGAAGATGGCTCTCTAATTAATACTAGCCCTTGCTCAAGAGTCAATAGAAGTCCGTTGCAATGAGGATATCAGGGGACACTG TCGCCGATACAGGTGTTAAACAACCTCTTTCAGCTGGCAGCCACAGAGTGGATGGCATTATACCAAGATTACATTATTACTCGATCTCTAAGATACGCC GAAGGTGTTCTAATGAACAGTTCTCGAGTTCTATAATATTACATCATCTCTAATGACACATAGGATTACAGCTCTGTTAGCTAACTAAGTACAAGGATAGATAA GGTAGATACGAGGTAAGTACGATTCTAATGCTTATTCAGCACTCGCAAGCACAGATGATAGAAGAGTACTCAGGAYGWGACATCCAGATAACTCATT GCAGCTGTATTCGATCGGCTTGTATACGCAACTACATGACTCGGATAACAACCTGAAGACAGGGCATCATTACCGGGATCGACATCTCCATCAACCAACGACAA GAGATGCGAGTGGCGTTTCGAGGATAGCCATTCCAGTACTCCATTGTCCTTCTCAATCAATCAGATAAGTCCGATATCTTGAAGGAACGCGGTTTAAACACCAAG CGAGTAGAATAACCATCTGTTGATCAACCATGGAATCCAATCCATCTACCAACCTGATGCTCTTAACCATTTTGGCCATCAGAAGGCGAGGCACTCTCCACTCC TGCAAGTACTTCAACTCACCCTTTAGAAAGGCAAGACCGTATTGGGAGGAGTCTCGAGACTAGGCGCTATCGCATTAAGTGTGTTTACCTTCGGCTATTCTCGGTC CTACTTAACCTTCGACCCGAGACTGAATGGAAGTTTACTGATCAGGGTTTCCAAATTAAGGGGTACACCGACCTTCTACTGTGGGAATGCATACAGGTT CCTACAATTTGACCGTTAATACATTATGAAGTNCACAGCGATCTATCAGCAACNTTCCAAGTTATCTGGCCTTTTCGGCACCATTGGCCTTCTATTGAAGGAGCTTCTATT GTGCTTTTNTCAATTATCATTACNTTCTGTTCTGCTACTCTTCTAGTGGGAGATCCTGACCTCAAGACNCTTAAACACCTTTCGCCCTGCTTCTTATGGTTATCATCGG CATTCATTTTCTCACTCCTATGAGTATGACCGGCATTTTTGAAGCTGGTGTCTTATGGAACAGTATGTCGGTGAGTTTAAANAATATCAAGA</p>
AC T7	<p>GGTGAGTGTACCTTGAAGAGATACGAGCCTCTATCTGTTTGGTAGCTGATGACTCTCTCTCTCATTTGGTTAAGGCCAGCTCATGATAAAGTGTCTTGA CTCCTCACTAGTTAATGTGGTCACTAACGGTGTGTTGATTGTCAACCAAGCATGACTGTGGCTATTGTCTTCGGACATATAATGGCCATCAGGACTATCTCTCTAA TCTCGGTTACTAGTAGTGGTATCTATCTCTTTGACAAAGGGCCACGATACTCCCTTCGGGGCACTATGAATACCTCTTGCCTTGAATGTGGTCAATGGGGCAA GAGTACATGGGTACCTATCTTGGTGCCTATACCACTGCTATATCTGTTCCGAGTGTATCTATCTCCCTTTCAGGGGGCCACGGTTTCATGCTCTAATGGTACT GTTTGAACCTCATCTATCGAAGCGGTCAATGATGATGTTGACCTTTAATAGGCTTACCGGATCCACTGCATTGGCCAGATGATTATCTCTCTTGTCCCTCC GGGGTACATTGGTCTTCCCTCGTCTGTTGCCCTCCACAGCTGACCTTATACCTCTGTATCTTTGGATTATGTTGTTGCTCTTCTTATGTGAAGGATCGATTCTAT GCTCTGCGCTAGCTAAGGGCTGTGGTCATAACTACTATGTTGAACCTGCGTGGCCTAACGACATTTCTACATCTTCCCTGTAGTATCTCTGGGTACCATCTCTCT CTCTTGGCTTGGCGTCAATTGAGAACCAGGCGATTGGTGAGCCAGCTAACCCGTTTGAACCTCTCTTGAATCTCTCTGAATGGTACTTCTTCCCTACCTTCACT TGCTTCGATTCTTCCAGACAAGCTTGTGGGAGTCTTGTCCCTGTCATCCGATCCGCTGATCCTTGTGCTTACTGCTTTCAGAACATTAACCGCTATCAGAACC CTTTTGGGCGTCTGTGGCATCTTGGTTTATCTCACATCGACCTGTTATGCGCTGTGGCTAGGTTACGGTTCGGTACTTGGTATCTCTGAGGCACTCCCATCTGTT AATGCTACTTAACCTCTTTTACCTCAACAAGTACTTGGTGCCGCGAGGCTACCTAACGGTGCCAAAGGGTCTAGGAAGGTGGTGCCTATCTATGGCTTGGAGAC GTTCCACCGATCCTCTTCTGAGAAGGTGATTCTGTCTACCAAGATCAGTGCCTCTTGAATCTACTCATGGAAGCAACGTAGGAGGGGATCTAATCTCACAT GTCTAACATGGGCTCGCCAGTCTTCACTAAGACCAATCCCTCAATAAGCTGCTCTTTTCACTCTCAATAGGTTTAAATAGTCTGTCTCTCTACCTCAGAGTGG AGGGTGTGATGAGTACGGTCAATCGTATTAAGGTTACTCTTCCGGTACCTTTCGGCTCAATCACTCGGGCTTACCATTTGGTGCAGTGGCTTTTCATCGTGA TCTCTCCCTCTCGCCCTCAAGCGATCAAGGGTTTTCACAGCCTTAAAGCATCTGCTAAGGCTCTTACGCGTGCCCGTTATCTGTCATCTCTACGTTGTCCGCTT TCCACAGTCCATCTCCCTTGTGACGAGTTGCTACCAAGCATCAGGCTCTGCTGATGTTTCCGTTTCACTATCTTACCCAGCGTTTGTCTAAGTGTAGGGTTG CTCGAAGGTCTTGCAGACTATCTATGGCTCCGATTCACTGCGAGGTCTATTCTAAGGGTTACAGTATGACACAATTTCCATCTCTCAGTCTCTCAGTCC ATAATGAAAGGTATCGTATTTGCGTACATGGGTGAGTGACTCTTCTAATGTTGGCTACTCCACTGTAAAGGAGACTGCCCTTCAACCGCAACGAGGGCAA TGTTCTTGGTGGACAGATGTGCCGATAGTTATTTCTTAAAGGCAACTCCTCTTGTAGCCATGTTAATTAATCTCCACAACGTCGTCTATCTCAAGTGA AGGGACTCTGTCAAGGTCAATGATGAGTACGATCAATAAAGATGATGATGTTGCTGGATAAAGGATACAGACACGTACGAAGACACCAATCC AGAGAAGTAATTAACCCAGGACAAATGTTGCTGACATCCGATGCTCGTATTAATCTTAACTCCGGGTCAATCGTTTCCATAAAGACACCAAGCTTCAAAAATG CGGTCAATCCATAGGAGTGAGAAAATGAATGACGATGAACATAAAGAAACGAGGGGCGAAAGGGATGTCTCCACTTGAATGTGAATGAATAATGTAGAAACG ACACTAAGAGTCTTAGAGATGAGGCAACTAATGAAGATGAACATTCGACTCATTTGTCGAAGGCTCTTGGTTAGGCTCTCAGACAGGTGACCGTGCCAC GAGCATGTTATCATCCGCAATGG</p>

Name	Sequenz
AC T8	<p>ATAGAGGTAGTGATAGCTAGCAATCAGTAGTCTATTAGGCTATGTTGGCTGATCAAGGACCGTGTCTACCGACCAAGGTACCTCGGTGCCCTCGGTATAATGGTA CCACTGCGTACCTTGGATACGAACTCGTATTCTCTCTCTAGGTACATTGTTAGTCTGTTTAAACAGTTCATCATCTAAGACCTTCACGTCATTACCTTATCACGG TATTAGGTCTACACCTTAGACTCTCTTTGGACTTCGATCTCTCTTAATCAACATTAGTACTGTTCTTTGAAATGTACGCTAGGAATGCGAAAGGTAAACGGTGGA ATGTGGTAGAAACCTTCGTGGACTTCCTCTCGGGGCGTCTCAGGCCACGCTGAACCCCTGTGGTAGCAAGCTGGATTAGATACCCAAAGTATGCACAGAGGTTAA CCCTGGCTAATCGTAGACTGGATAACAAACGTTAAGATTAAATAGGCTCATCTACGAGTACGCCGTCGGGGTGAACCTAAAGGTGCTGGTGGTAATTTAGAA CAACGGTGGAACGTGATGATTTAATTCGATGTTACGCGATACAGCTC:ATCCACGATCCCTCTACAGCCTCGTAAGAGGTTCTTCTGCCTATACGGTAAGGTGTTG CATGGCTGTCTTAAGGTGATGCTCACGACATAATCACCACAACCCCTAATCTCTTCTCTTTATTGGAGGAGGTTTGATCAAGGTCAAGTCATTATGGCCCATGCG TGGAGCGATCCATCAGTTACAATACCTGGGTTCACTTCCGGTCGTACAGCGGCTCTCTGAACACTAGGTCTACGAATGAGCGGTTGAAATGCCCTCTGAAGCT GGAATCGTTAGTAACCCCTACGGTTAGTTATACTARGGTGAATAAGAGATAAGTTGCATTACATCTGCCGCTCAAGCAAGTAAAGGACCCCTGGGAATATAGGCCTT CGATGGTCTCCCGTAAGGTCCGATAAGTGTTAAGTCGAAACATGGTAGGTTAAACGGAAGTTGAACCTGGTAAAGGAGGGAAGTTCCCGATTAAACAAAGGTTAA GGAAACGTACGAAGGATAACGAAGGGTATGGATCTCTCCTTCAACATCTTAGGACAAATCTTATCAGATGAACGACATCTGGGTAATCTTAAACTCACCACCAAT CGTTTCCATAAAGACACCAGCTTCAAAAAATGCCGGTCAATCCATAGGAGTGAGAAAAATCACAGACGAGAACGAGACAGAAATGACGGGAGAAAGAACGATTAG TAGAGTTAAGACAGTTAAGACGTGGATCTGGCAGTTCTACACAAGGCACAAAGGCTCCAACGAGAACCTNGANTAAGAATTACGAGACTCTAATAAAGTTNGTT ATGTCGTTTCATCCGACAGGGTATAGGTTTGAATCCTATGTCCGCTCTATATATTATTAAGCAATCCTCGGTTAACGCAACGCTCGTATGGAAATANCATA TACTAATGGGACGCTGTTCCCATGTAATAGTGAGTAATGCGATCCATAAAGAAATTGAAAAAGATAAGTCGCTATACCTCTCTGAAGGGAACGCACGTGAGTAC AATCAACATGGTTCGTCTATTAGGCATACCAATTGGTTGCAATGATGGGTACTTAGGCTTAAACGGCTCTATAGCAGCTGGATCTGAAATACGACACGAGGACCA ATAGTGGGATGTAGTGGGTAATATCCGCAATTCATAATGTCTTCGACGGTGAGACGGAGTTACNTACGTGTGGGAAGATGTCTATGACACTCTCCANCCCG GATGCACGATAAAGGATGCGCAGCAGTCCGGTAATACATCTGTGGCAGCGTTGTGTAAACGTTATTTCGATGTTAAGCANGCTTAGGCATCTANTCTTAATATCT CTACGANGACCTCATGGGCTCTCCAGGGGAANGCTGAAAGCCTGAAGTNAGTTAGTTAAGACGTGGATCTGGCAGTTCTACACAAGGCACAAAGGCTCCAAC GAGAACGTNGANTAAGAATTACGAGCTCTAATAAAGTTNGTTATGTCGTTACATCCGACAGGGTATAGGTTTGAATCCTATGTCCGCTCTATATATTATACTAA GGCAATCCTCGGTTAACGCAACGCTCGTATGGAAATANCATATACTAATGGGACGCTGTTCCATGTAATAGTGAGTAATGCGATCCATAAAGAAATTGAAAA GATAAGTCGCTATACCTCTCTGAAGGGAACGCACGTGAGTACAATCAACATGGTTCGTCTTATTAGGCACTACCAATTGGTTGAATGATGGGTACTTAGGCTT AACGGCTCTATAGCACGCTGGATCTGAAATACGACACGAGGACCATATGTTGGGATGTAGTGGGTAATATTCCGCAATTCATAATGTCTCTCGGACGCTGAGACGGG GTTACNTACGCTGGGAAGATGTCTATGACACTCTCCANCCGTAGTCAGCATACAAGATGTCCAGCAGTCGCGGTAATACCTGTGGAGGCTGTGTGTA CGTTATTCGATGTTAAGCANGCTTAGGCATCANTCCCTAATATCTCTACGANGACCTCATGGGCTCTTCCAGGGGAANGCTGAAAGCTGAGGTTNAGTT</p>
AC T9	<p>GTCGCCACATAACAACCTGGTATCGACAATGTTCAATCAATGGCTGCGTCATGAAGGTTCCAGGTAGTGTCTATTCCGTTAGGATGGGTATAAACTTATCTAACA AGAGGGCAACAACCCCTAGGCTGTACTAAGGCGTTCCATACGCATTGAGTGCTTAGTGCCGTCGGTGCTTTAATCACACCTTACAAGTCGATTAGCAGTATGCA TCTCTTACGAGTGTCCACCAACTTAAAGGTTTACACGCGGTAGTCTACATTCTCAGTGAATGCGTAGCCGACGCTACGCCACTTGGGTAGAAGCGCGTACCTTT CCTTCGGGATTGAAGGGTAGTGATGTTCTCTTGAAGTGTAGTCTCAGGTCACAGAAAAGACCCGCTTAATCCACTTGGTTATCCGCTGTCCGACATGATAGGG GATGCACACGCTTAACCTCTTGAATACATGTTAAGGAGGCGCTCAGGTATGATTCTTGACTCCATACACTTTTACCTTCGGGTAATGGTCAAGTACTGCTCT TGCCCTCTGGCACATAGGCACTGTTGCTTAAACACAGGCTGGGCTCAATAATGAAACGTACATGGCTAACTGGCGTAATGAATTTGACAACCGAGTTATGAAAC CTAGGGATAAATCGTGTTCAATGAGCTGTTTAAACAAAACACAGGTGTAGGTTACGACGATCTTGGCTCTGCGCCGACATGTGATCAGTGCTTCAATGA GTAACATCGCGGTAACCTGTAACGCTCAAGGTAGCGAATTTCTGTCAGTAAATCTGACCTGATGAACATACGACGAGGCTGTTCTTACAGCA AGTTAATGGTGAATGACACTGGACGTGAAGATGCGTTCGTTGGGAACATGACAAGAAGACCTCAGGAGCTTTATACGCAAACTAGCGGTACTGTGATCTGTT TCGGCTACGGTGGTATACCTCTGTTGCCATGCAGCATCACTTACCATTAACAGGTGAGGTTCCGTTAGACGGTTGATTGGGGCGATCACTCTTTTACTCAAC GAGAGGTTAAACAAGGATGGCAACCCGTCATGAAAGCGGTACTACAGCTAGAAAGGTAGAACCAATCCTGAGAGCTAGAAGTTATTCAATCTAGGCACAATAG CTGCTTACTGATTGTAAGGCAACTTAAAGGATAAAAGTTACCAAGGGATAACAGGCTTAATGGGAACAAGAGTTCTTATGACTTCCGCTCTTGGCACCCTCGA GTGCGGCTTACCTTTTCCATGAGAGGCAACAAGGCTCAAGGGTGGAGGTGCTCACTCCATTCAAGGTACACGAGCTGGGTTGAGAACGATGTAATCAGTTTGGT CTATATCTTCTCGCATTTATTGGCATATACAGCTGGGTCACGGTATCTAGTACGCAAGGACCGATACATAGTCTAGTCTCCCAATAACGCCTAGTTACACGGT ATCACTGTTTCGAAGATAAGTGAAAGTAAGGCTCTCGGCTGCATACCCGACTGGGTGGCTGTTGTCATAGGTGCTGGAACAATGGTCAAGGTAATCAAAACAAAGG GTATCAAAAGACAATCAAGGTTAAGGAAACGTACGAAGGATAACGAAGGGTATGGATCTCTCTTCAACAATAGAGGACAATCTTATCAGATGAACGACATCCT GGGTAATCTTAACTCGGGTCAATCGTTTCCATAAAGACACAGCTTCAAAAATGCGGCTCAATCCATAGGAGTGAGAAAAATCACAGCAGAGAGAACGAAGAC ATGAACGAAGATAAATGTAGAAACGACACTTATAGATAATGAAACAACCTTATGAAGGAGCGCGTACCACGCAACACGCCATTAGGCAGNTCTCTATGCCCC NCCGAACGAATACCTTTTAGTAAGAGGGTGAACAGTGACACAAAGGCGGTGAGGCGGTGAGGCGCTCACGCGTACTTACATCCATGAGTGATGAGTACT GTTAAACATACCCAGCGGTAGCCAATAATGCAAGAAACCCCTGAGAAGGGAGTGAAATAGAACTTGCAACAATTCTGCTTAATCTAACGAGCACTGCTTGGGAA GAAAGCGAGAACAATCAGAAGATAGACTAGTGGTCTGCTGAGTCCGAATGCCTATGATCTAACCTGGAAGGCTGCACTCTTTATGAGTTTCAAGGCCGAT GTGAGGAGTTATTGGAACCTGCTCACTGGATCTGGGGTGGTGGCTAAATGTCTATAGGCTAATATCTGTTGCGTTGCAAGGATCTTAGCAAGATAGACAA GAAGTAGAACCGCTCTCTCTTGAAGGTCGCTAGATACCGGTGGGCAACATAATGTATTACGGTCAAATTGTAGGAACCTGTAAGTGCATTCCATTAGGTAG AAGGTGCGTGTGGCCTAATAAGGTACCTGATCAGTAACTCCATTCACTACGCGGCTGCGAATGGTTAAGTAGGGCTTAATTGTCCGAAGGTAAAACGACTCA CTGCGCTGCACTGAAAGAAGGTTACCGTTAAGTCTCGGTGGTCCATTGAACCTTGCGAGGTTATCTTGACTTCGTAATAAACAAGCAACGTTAGTCGGAGTT CCATCTCTAACTTCCCCTTGATTAGGGGCTAACGA</p>
AC T10	<p>TAKTTAGTATCATGTGTAATACCTGCGTACATGAGTGTGATTGCTCTGCGCAATGTTGCCTTCTCTTATGTTGTTATCGTGCCGCGTGTCTGCTTTTGAAACA AAGAGGAGACGACTAGCTCTGTTTATTATGAGAAGTGAAGAACTGTTTATTAACACCATATCGAGATCGAGTAATGATGAATGTTATCACTCTTTGT GGTTATCATCAGATGCCACGTTATCAAAGAGTAAGAATGTAATGTAATCAGTTACCCCTTTTAAATGGTTAGCGGGTATCTTCCCTGCCGTGCTTGTGATCGG TATATCTTCCCTCGCAATCACTTCTGCAATTGAGTTCTTGACTCTTGCAGCTTAAACAGCTCTAGAGTTCCTACTGGGACAGAGCGCAACACCTCATATCTC TAATGTGGTCACTGTGATGTTGAGCTACCACGAACCTTCTTATATGGGATTGTATCAGGGGACAGACCTCGCGTCCCGAGTAACTTATCGGGGACTA TCAACTATCCAGGTTAAATCTTAACCTCAGGAGTGAGAAATAAATGACGACGACGAAGATGAATGACGTTGAAGAGAACGATTAGGTAATATGAGAAACGAC AATCAATGGTCTTAGGACCGAGGTAACAACCTTGATAATGGTACTGGAACAATGTAGAAGCTGGAATGGTAATCGATGGAAGGATAACGAAGGGTATGGATCT CTCCTTCAACAATAGAGGACAAATCTTATCAGATGAACGACATCTCGATAATCTTAAGCTACCGGACAATCGTTTCCATAAAGACACCAAGCTTCAAAAGCTCGG TCAATCCATAGGAGTGAGAAATGAATGACGATGARACATAAGAAGAACGAGGGCGAAAGGTTAAATGTGCTTGAAGTCAGGATCTCCACTAAGGAGTAGA CAAACGAATGTAATGATAATTGATGAACGACAATGAAAGTCCTTCAATAGAAGGCAATGGTGCCGAAGGCGAGATAACTTGAAGAGGTGCGATAGATCGCTGT GGACTCATAATGATTATTAACGGTCAAATTTAGGAACCTGTAAGTGCAATTCACAGTTGTGAAGGCTGGTGTCTATCGGGAACCTTGGTCAGATGTCCCTACCTTG AGTAGGTTAAGTAGGCTGAGATATGGCTGAAGGTAACCTGCCGCTGCGATAGCGCTAGTCTTGAACCAACTCAATACGTTACGTTCCCTGCGGACAAGG TACGAAGTCACTGACTTGGGGGAGAGGCGCACTGCCTCGGGGTTGGCTTAAATGAAGGTAGAGAAACATCAAAACAGGCGGTTAGAAGGGGAGGCTGGAATGGTT GGTCGGTGCAATTAACACCTTGAAGTGGCACAACACTCGTGCATCTTATACTTTTATACCTTTACAGGTTACACCGCTGGTCNGGAAAGGACTCTT GGTTGCTGCTTTGNGATGGGTGAGATACCTCTTGGTAAGCGGGTACNATGGAAATGCTTACCGTCACTTGTGGTGCAATCAGGTATGTATCTTCAAGAAC GTGCGATTGTATGAGTCTAGTTACTCTGTTAACTGCGATCAGAGGTACTGGTCTCGGTCTTCAATCCGAGTCTTATGGGACAGTAGGAGTAGTTAGACGGT GATCCTTCCACTTGGTAAGTTACCTGGAGGATGTGATCATTAGTGGTTACCTCGTTAATACGCAATCAGTGTATGAGGTATCAAGGACCGTGTCCATCCATGC CTGTTAAGGTTGCTTTGTGCAACGAGGCTTGAATGGATCACTACTCTTACGATACCGGAGTGGAATGTTACCGGCTGAGTCAATGTTACCGGCTGAGTCACTTT GTAATAGTGCAGCAATGTCAACGCTCTGAGTCTTCAATGCACCTGAGTACTACGCTTACGCGGATGTTAAGTAGCANCTCTGGTCATCGGTCTTGGTA TCGTCTATACCTAATACGTA</p>

Name	Sequenz
AC T11	AAAGCACCGACGGCAGNTAAGCANTCAATGCGTATGGAACGCNTTAGTACAGCNTAGGGGTTNTTGCCTCTGTGTTAGATAAGTTTATACCCATCCTAACCGAAT AGAGACANNACCTGGAACCTTCATGACCCAGCCATNGAATGAACATAGTCGATACCAGTTGTTATGTGGCGANTCGTTAGCCCTTAATCAAAGGGGAAGTTAG GATGGAACATCCGACTAACGTTTGCTTGTTTTACGAAGTCCAAGATAAACCCTCGGCAAGGTTCAAATGGACCACCGGAAGACTTAACCGTGAAACCTCTTTCAGTGCA GCGCAGTAGGCGTCTTTACCTTCGGACAATAAGCCCTACTTAACCATCGCAGCCGTAGACTGAATGGAGGTTTACTGATCAGGGTAGCTTATAGGCGACACCCG ACCTTCTACTTAAGGAATGCACTTACAGGTTCTCAAACTTACCGTTAATACATTATGTTGCCACCGGATATCGACGACCTTCAAAGAGGAAGCGGTTCTAC TTCCTGTCTATTGCTATAGATCTTTCGAACGCAACCATAGATTAGCCTATACGATTGACATTAGCCACCAACCCAGATCCAGTGACAGCTTTCGAATAACTCCTCAC ATCGGCCCTTGAACATCAAAAGAGTGCAGCCTTCCAGGGTTAGATCATAGGCACTTCGGACTCAGGACAGACCAATAGTCCCACTAGTCTATCTTCTGATTGTGTTCT CGCTTCTTCCACAAGCAGTCTCGTTAGATTAAAGCAAGATTTGTGCAAGTTCTATTCTACCTCCTTCTCAGGTTCTTGGCATATTGGCTCAGCGCTGGGATGTGTT TAACAGTACTCATCACTCATGTGGTATGAAGTACGCGTGACGGCCTCACCGGCTTTGTGCTACTGTTTACCCTCTTACTAAAAGGTATTCGTCGGAGGGGATAG GAGAAGTCCTAATGGCTTGTTTCGCGTGGTAGCGCGCTCCTTTATCAAGTTGTTTCATTATCTAAGATGTCGTTTCTACATTATCTTCGTTTCATGCTTCCTGTTCTC TCGTCGTGATTTTCTCACTCATGGATTGACCGGCATTTTTGAAGCTGGTGCTTTATGGAACAGTATGACCCGGAGTTTAAAGATTACCCAGGATGTCGTTCA CTGTAAGATTGTCCTCTATTGTTGAAGGAGAGTCCATACCTTCGTTATCTTCGTCAGCTTTCCTTAAAYCTTGTGATTGTCCTTGTATACACCTTGGTTGATTAC TTTGACCAATTGGTTCGACCACTATGACCAAGCCAMCCAGGTGGGTATGCAAGCGAAGACGCTTACTTCACTTAATCTTTCGAACAGNTGATTAAACCGKGTTAT CTAANGGCGTTTAAATGGGGGAAGCTTAGCTATGTATCGGTCCTTGCGTACTAGATACCGTGACCCCAAGCTGTATGTCGAATAAATGGCAGGAATAGATATAGAC CAAACTGCTTACCTCGTTCTGAAACCCAGCTCGTGCTACCTTGAAGTGAAGTGAAGCACTCCACCTTGAACCTTGTGCTCTCATGGAAGGTAAGCCGACATCG AGGTGCCAAGACGGGAAGTCGATAAGAACTCTGTTCCATTAAAGCCTGTTATCCCTTGGTAACCTTTTATCCTTAAAGTGTCTTCAAGATCAGTAAGACAGCTAT TGTGCTAGATTGAATAACTCTAGCTCTCAGGATTGGTCTACCTTCTACGTTGAGTAGACCGCTTTCATGACGGGTTTGCCATCCTTTGTTAACCTCTCGTTGAGTA AAGAAGGTGATCGCCCAATCAACCGCTCAACGGAACCTCACTGATTGAATGGTAAAGTAGTGCATGTGCAACAGAGGTATACCAACCGTAGCGGAACAG ATCAAGTACCGCTAGTTTTCGCTATAAAGTCTCTGAAGGTCCTTCTGTGATGTTCCCAACGACAGCATCTTCAGCTCCAGTGTCACTTACCATTAAACTTTCGCTAAG ACACCCATCTAGTCGTTCTATGTTTCATGCAAGGTCAGTATTAGCTGACAAGGAATTCGCTACCTTTGGAACGGTTACAGTTACCGCCGATGTTTACTCTATTGAAGC ACTGATCAATGTCGCGCAGAGCCAAGATCGTCGTAACCTACACCTGTGTTTGTAAACAGTCGCTGTATGAACACGATTATATCCTAGGTTTCATAACTC GGTTGTCAAATTCTACCGGTCAGTGTACGTTTCAATTAGCCGAGCTGTGTTAGAAGCAACAGTCAGGCTATGTCACCAAGCAAGGACGACTCTTG GACCAATTACCCGAAGGTAGAAAGTGTATGGAGTCAGGAATCATACGTGAGGGCCCTCGTTACCATGTATTACAAGGAAGTTAGCGCTGCATCCCTATCATG TCGGACAGCGGAATAACAAGGTGGATAACGCGGGTCTTCTGGTGANCTGAGCTACTCAAGAGAACGATA
AC T12	GACCAGACCAGGTTTNACNTGCACATCAATGGTGGTGCGNATGGTGATCCGAGCTAAATACTGCGCNCGATCGTCAAGAAGTATGNACGTAAGTCNCAAGTTTG GTTCCATCNCTCCTTTGATCGTAAGACTCTCCGTTCCGATGGAGNGTTCCGATAGCTCTAATTAGGGGTTGGTACACCTTCTCATGTTTCCCTTGGCGTCTTCTTCT CCTTGGACATCTCTGCGATCTGCTGAGGCATCTTCAAGGAGATCTGGAAGTGATCTTTTCAACAAGGTTGAGGCTCAGTACGTTTAACTAGAGAAGTTG GGTGATGAGGGTACTGCAACAGGAGGCTTTCGTTAGTTAAGTAGAATGTAATGTGAACGTTTGAAGACCTTCTATATGTTGAGGAAGTCTACATTCGAAGCGCT GTATGGCATCAGTTAGGTATGAAAGGCTTTTCGTCACACTCAACAACCATCTGTATAGAGATGTTTCTTATAAATTAGGGACTATACACTAGTTCGCGGATGGGAC CCTTTGTCGCCAAAATTTGAACCATGCAAGCCTATGATTAGACCTTGTGTAGCCTACCCGAAGTCAATTCAACATAGCTGTTTCTTATTAAGCAAAAGCAGA TCGAAGGATACAGGCTAGATGATGACGGGCAACTCTAGGACAATCTTATCAGTGAACGATCAAGCAGGAYATCYCATAGGATGAGAATAATCACAG ACGAGAGAACGAAGACATGAACGAGGTGAAAGNTAGGAACGACTACGATTAAATGATGAACGACAACCTTAATAGGTGCCTAACGGCATAAGATGAAAGGATCC CTTCTCGATAATCCCTGCAACGGGCTCGCAATTAAGAGTGTTATGGGTGAAGGAGTGAATGGGATCTCTAATTAACAAGGCTCCTCTGGAAGGGCCAGCACT CAGGAAGAGGTGACGTCACAGTCTCAACCGGTATACCGGATAGTACAGTCAAGTAGGTAAGGTAAGGCTTCTGTTTCCGATGTCACATTGTGTTCTCAATGAT CCTGGTCGTCATCAGTGTTTCATCTAATGCACAGGTCATCTCGGGTTGGGCAGGACTAATGGCTCTCTATGAGCTGATCGTACCAGCCCATCCGATCTGT GTACACCCCTGTCTGCGCTCAAGCCGACTACGTCATTCTCAAATGCAAGACTTGGTGTTGTGCTCTCTCTATGGATGGTCTCTCACCGGCTCTCTAATCAGCG TGCTTGGACCATGGAGGTATGTTGCTGCACCCATCTCTTCAAGTGGTCTCTTATGCTCGGCTCTTGGCACTGGGCTTATGGGACCTTGAGCTTGCATCTTA ATGCGTCTACAGGTAAGCGTGTCTCGGATCTCTCGGATCTCAACAAGATCTTTGAAATCATCTCTCTAGCACTCGGCTGACTGTTTGGCTTGTGTTATGCCCCAT TGGTGGTATCTTTGGTCCGGGTATGTGGGCGTCCGATGAGACAGCTGTTGCAAGTGCGGTACGTGCAATCACGCTAATTAATCTCATTCTAGCCCTATCGCGCTT CTTCTTCGGTACCATCTGCTCATCATACAGGCGGAGTATTATCGGCGGGGTGGGATCTGCGCATCTCTTCCGAGCCGGGGTGGCTTCATCTACCAAGCG TAGCAAGTATTCCTAATGAGTCGGTGCTGCTCTCCATTGCGGCTGTTCTTCACAGGCTGATTACGCTCTGCGTCTGATGCTCTGCTCTCAACACAGCCT GTCGAGCTTAACGGTCCGACAAGGTATCATTTGGGATAATGCCTATTTTAACCAAGGAGATTGAGACCCAGGTGCGAGCTATCGAGGGCAGCGGGCCTTTCGCTCAAT GCCTCTATGATGAGGTGCTGACAAGCTCTATCTCTATGATTACCTTGGATCCAATCTCTGCGAAGGGCGGTTTGTTCCGTGCGGGTCGATCACAAGGGGTGATGG TATCATTGAGAATTGGTAGGTCAGCCTGACTTCCAGAATCGGTCNATTAAGCTTCNAGTACGTNAGGGCGCCATCGTCTTCGAGACCTCCCCGGTACTT
AC T13	TCGATGGTTGCGTACCTACAGACCTCATCACTCTCGATTCCACTCCCCGTTCCGGTTCCGACTAAGGTAGCGTGGATGACAGCTGAGATGGTTTCAACGATTGTC CACAGTAGAAGTACAGTCTTCTCGAATATTCGAATTCGCTTAATACAGCGTCGCGTAAGTGCGTATCGTTATGCTATGACAGGTTTCTCCCTCAATCTCTT AAATGCTTAGAACTTGGGTTACCTTCTGTGTCAGCCTTATTGTCTGCCTCTTATTGCGCGTTTTCGATCTAATGACCTTGAACCACTCCTCTAACTCTCTTGATTA ACTTAACGACTAGGCGATCAAACTAATGTAGGCGTAAAGAACGATGATCGAAACGTACGAAGGATAACGAAGGGTATGGATCTCTCCTTCAACAATAAGAGGAC AAATGTTGCTGACATCCGATGCTCGATAATCTTAACTCCGGGTCAATCGTTTCCATAAAGACACCCAGCTCAAAAAATGCCGTCATCCATAGGAGTGAGA AAATACAGCAGAGAAACGACGAGAAAGACAGAAAGAGGACAGCATAGATAGCTATGAGAAGACGACATGAAGAAACCTTCTTAGGAGGCAACTAGAAAGATGAA ATAGGCCTAACTACGGTTGGTCATGATTAAGCAACCTCTGTTGGGTAGAAACATCAGTTAGCTAAGTTGCCCTGTTGCAATGGTATCTAGAATTCAAGTGCCT GGCTACTCAAGAAACCTCTGAGGAGACGAATATGAACCTGTCGCTCGATGGAAATTCAGATGCAAGAACCTCAATGTGAGTTAAGATGCCATTCAGCATCTAT GGGTACCTCCGATGCTCTTAAAGTCAAGGATTACTCTCTCTATTATGAATGAATAACAGTCCCGGTTCTTTCCCAAGGTAAACATCTGTTGACCTCCCTCC GCCTCATGGATGATTGGCTCAAGCGTGACCGTTTCGTCTTATGGCTGGTCCGCGCTTCTCTCTCTCCCTACTCGTATCTTGCAGTCGGCGGTTGGTTACCGGT ACAACCTTCTGTACCTCGTGGTTTACCACGGTCTTGCCTCTTATCTATAGGGTTGTAACCTCTCACGCTGCGGTTTCTACTCCAGCTAACTCTATGGGTCAT CTTCTCCTCTTCTTGGGTTCCAGAGGACGCTGGTTCCTTACCGCTGGTTCCAACTGGTGGTCTTTGGAACTTGTTCGATTCATTCAGTGGTCTGTAGGTTGATGTT GTTTCTCCCTCTGTCAGTCTCAGATGTTGCTTCCCTATCGTCCGTCGATACCAAGCAATTCGCTTCTGCGGCTCTATTCGCGTCTTCGCTCTCTTCTGCTA CCCTCTGGTCAGTCTCTGGTCTTCTGCTCTCTTGGTGTTCGACGATCTCCGTTCTCTTCTCTTCAITCAGGTTTTCACAACCTCACTAACAAATCAATCC ATATGATGGGTTGCGCTGTTATCCTTGGTGCGAGCCTCTATCTGCGATTATCGTGCAGACGGTGGTGACAGTATTAAGAGATGGTAACGCGTACACTACCTT CAGGCGGCTTCTCTCACTCAGCCAGGAGACATATGCGATGCTACGCAACGCTTCTTGGTCCAGGTGTTCCGTTGATGACTCTTCAACAGCTCTCAACAGGCTTGGCTT CACTTCTTCTCCTCTTGTACCAAGTGTCTGGTATGTGGACTTCGCGATCGGTATTGTGCGGCTCGCTTCAACCTCAGGGCATATGATTTCAATTCACAGGAGCTT AAGGCAAGTGAAGATCCAGATTCGAGACGTTTACACTAAGAACCTTCTTCTAACAGGGTATTGCTCTTGGACTGCAATCCAGGATCAGCCTCATGAGAAT CTAAGTTCCTCGAAGAGGCTCTTCCAGCTGTTAAACGCACTCAATTAACATAAATGATTGGATAGCCCTTTCGATAGTGGTCTGATTGCTTCCGGTATTCAGT TCAGTGTAAAGGTGATCTCGATGACGTTAAACATCTTAGCCTCGTACCTTAAATGGTACTGCGTGAAGGCGCTTTTCTGACATCTCCAAAGATAGGAGGATT GGCTAATCCATGCTATCACTATCCCATCTTTGTTCTCGCGCGGCGCTATCTTTGTCCTTCTGAGACTCGGATATAAGGATATTGCGGCTACCAAGTCTCATCAGTATT TCTCTAATGAGCGTAAGCAAATCTTCAATTAATGAGAGGTTCTCTGCTAAGAGTGAGCTTGAAGATATCTAATCCGACCCGGTCTCGGTTATCCAGGGGCTTAT TGTAGAGC
AC T14	CCAAAGTTTNGNCAATTTTATAGGNGGGTTTATGTGATTAGGNTAGCAATCCNGTTAGNTNANNATTGNTAATGTTGGTTGGATCCAAGGCCCGCTGTTCNTA CCGACCGAGNACCTTNGGGTGCCCTCGGGAATAATGGTACCACGCGTACCCTTGGATCAGCAACTCGTATTCCTTCTCGTAGGACATTGTGAGTCCTGTTTAC AGTTCTATCATCTAAGACCTTCACGATTACCTTATCACGGTATTAGGCTACACCTAGACTCTTCTTGGACCTCGATCCTCTTAATACCAATTAGTACTGTTCTT TGAATAGTACGCTCAGGAATGCGAAAGCAACCGGTGAATGTGGTAGAAGCTTCGAGCACTCTTCTCGGGGGTCT

131

Name	Sequenz
	TTCTCTATAAAGAGGAATCAATGTTGAATTGACTTCAAANAAGGACTAATGATAGTCTCCGATCGACTAAAAATTGTGCGGCGAGGGAGTGTGTACCGATCCTA ATAAGGAAAGAGTACGACGTGGCATCAAGATAGATAACCCACAGAGGTGGGAGGGGTGTGCTGCTGCAGGATAGTCTTTTATAACCCAACCGTGACGAGGCCAA CAGTTCAAGGTAGACGTCTTAAACAGTGTAGAATAAGATGGGAGACCCAAATATTGATTTCGATGGCATTAAACCACCGAGAAGGTCTTCGATATCAGAAGTGTCT GCTTGAGGAGTCACGRARRACTCAGGGATTACATCACCTGATAGGTTCTGAAGGAAGATGACCATATAGCCTTACAGCTTAGGTTCTCAGCTCTCTAACTAAATATCA GCCGTTGCTCAACAGCCAAAATAGACCTGTATCGCATCTGACTCAGTGACTACGATCATTAAGACCAGCGTGTACCTTACCAGAGAGATATACCAGCATAGGCAC AACAGAAGCCGGTGTAACTCCTTAAACAGCGCACATCTTCCACACCACCTATTACGCGGACAGACGGGTTGCCACTGATCTCGATTAAAGGACACGGATGATAACA ACTTATCATTACATCTTACCTCGAAAGGCAGACATAGGCCATTCTCAGGACTTCGGCTTNAAGACAGAATGCATGAACTCGTGGTAGCCAATACAACCTCGCCA TTGACCACATTCGACAGAGGAGGGTTTGCCTCAAGCAAGCTTACAGCATACGTGGCCAGACCCCGAGGGGTGGAGGAGCATACCACTCGCATTGAGCTATTA AAGAGAACCATCGTTCTTATCTCTAATTACAGCATGATAGTAACTACGCATAGACGAGATGGCAGTTGACAGATACAATTACCTTACGGGACTGCATTGATAGG TAAGGGACGTGGATGCAATACCGCACAGGTGATTACATTTGTNCGAAGACATACAACCACTAACATTGCCACATTGAATAGATGGAGGTGTCGGTGTAGGGCCCA GGAGGGCAGGAAGACGTGGCCATTCTACCAATGAGGAGTCAACCACTACACTAGAANTAAGATCAAAGCGATGAGTTACAGCTGTTACCCGTACCGTTTACATC ACCGGGTAGGAAGCGATCGATACGCAACTGCATGGACCGTAGATGACAAGGCATCATTACACGGAACCTCGTGAAGTNTAAGAGACAACACAGATGACTCCC CCGAATAAACAGGGCAACTACAGTCTTCCATACCACTAAGCTAGAAGCGTTGAGGATNACATTCCGTCACCTCCATTCTACTTACCTCAACGAAGAGGCA GAGATAGGTCTCTCATCTAGCTTATCTCNAACGAGGCACGGACGATCAACCTGGAGCCGAACC

9.3 Oligonukleotide *A. carterae*

Name	Sequenz	Name	Sequenz
AC_T1_for	TACCTTGGATCACGAACTCG	prk_Ecofor_AC	GAATTCATGGCCCGATCGCAGTCAGG
AC_T1_rev	ATGGGAACACGCGTCCATTAG	prk_Bamrev_AC	CCTAGGCTATGCCTGCTCGCCAGTG
AC_T2_for	AATCTATGCGAGCTGTATGC	psbO_Ecofor_AC	GAATTCATGCGCGGTTTGGTGGCCTTTGC
AC_T2_rev	TAAGTAGTAAGCTCGATGTC	psbO_Bamrev_AC	CCTAGGTCAGACAACCTTGGCTAGAAAG
AC_T3_for	AAACACTCGTGCCCATCAG	rpl33AC_EcoRIneu_for	GAATTCATGCACATGATGGCAGG
AC_T3_rev	TGCGGTTGGATGGGTCCGTG	rpl33AC_BamHIneu_rev	GGATCCCCACGCAAGCCCTTTCAACTC
AC_T4_for	ACTGGGATCTGGGGTTGGTG	psbO_Bamrevneu_AC	GGATCCCCAGACAACCTTGGCTAGAAAG
AC_T4_rev	TTGGTTAACTCTCGTTGAG	gpdA_Bamrevneu_AC	GGATCCCCACTTCTCGGCATCCACC
AC_T5_for	ATACCTTCGTATCTCTCG	prk_Bamrevneu_AC	GGATCCGTATGCTGCTCGCCAGTG
AC_T5_rev	TGAGTGCTTAACTGCCGTCC	prkAC_intern_for	TGATGGGTGCTCAGATGGAGG
AC_T6_for	TTGCTGCGTTCGTATCTTGC	gapdh_zigfor_sacII	CCGCGGGAGAGTCTGCGCTCTGAAAGAGGATC
AC_T6_rev	TTATCTGGCCTTTCGGCACC	gapdh_zigrev_apal	GGGCCCCGACTATCTCAAAGGGCCAAGTCC
AC_T7_for	TCCTGGTAGACAGAATCACC	gapdh_zigfor_xho	CTCGAGGAGAGTCTGCGCTCTGAAAGAGGATC
AC_T7_rev	TCCTCAGACAGGTGACCGTG	prk Ecofor	GCTGAATTCATGGCCCGATCGCAGTCAGG
coreoutAC_for	AGGTGAAAGGTAGGAACGAC	psbO Ecofor	GCTGAATTCATGCGCGGTTTGGTGGCCTTTGC
coreoutAC_rev	TGGAAACGATTGTCGGTGAG	rpl33AC EcoRI for	GCTGAATTCATGCACATGATGGCAGG
AC_T8_for	AAGAGGATTAGGGGTTGTGG	s11_prk_rev	CACTGGCGAGCAGGCATACCGTGACCACATGGTCTTCATGAGTACGTAATGCTGCTGGGATTACATAAGCTTAGC
AC_T8_rev	ACCTCATGGGCTCTTCCAGG	s11_psbO_rev	CTTCTACGGCAAGGTTGTCTGCGGTGACCACATGGTCCTTCATGAGTACGTAATGCTGCTGGGATTACATAAGCTTAGC
AC_T10_for	TTTAACACCTTTCGCCCTCG	s11_rpl33_rev	GAGTTGAAAGGGCTTGGTCCCGTGACCACATGGTCCTTCATGAGTACGTAATGCTGCTGGGATTACATAAGCTTAGC
AC_T10_rev	TTCTGGTCATCGGTCATTGG	gdh3'intSpe_for	ACTAGTCACTAGTTAATCTTGGTTG
coreoutAC_for2	ACTCCGGGTCAATCGTTTCC	gdh3'intSpe_rev	TGATCATAGGAGTGATCGGTATGAC
AC_T12_for	ACTCGATGACCTCAACCTTG	gdh3'intSpe_rev2	ACTAGTTAGGAGTGATCGGTATGAC
AC_T12_rev	TGATGAGGTGCTGACAAGC	pcp3'intSpe_for	ACTAGTAGGTTGCGAGCTGGCACCTC
AC_T13_for	TGTGATGAGGTCTGTAGTGG	pcp3'intSpe_rev	TGATCACCTGAGCACCCAAGTCAAC
AC_T13_rev	TGTGATGAGGTCTGTAGTGG	pcp3'intSpe_rev2	ACTAGTCTGAGCACCCAAGTCAAC
AC_T12_rev2	TCGGATGGGACCTTTGTCTG	psaD_forSP_ncol	CCATGGATGGCGGCATTCAAGG
AC_T14_for	ATCGTGGATGAGCTGTATCG	psaD_forTP_ncol	CCATGGGCTTCCCGAGCGCTCTTCG

Name	Sequenz	Name	Sequenz
AC_T14_rev	TCAAGGGAAGCTGAAAGCTG	psaD_forTMD_ncol	CCATGGCTCTCGGCAGCATCGTTGACC
AC_T15_for	ACTTCTGGTCAAGGGTCATC	psaD_forTP2_ncol	CCATGGCCGAGTTCAGTTGTGAGGC
AC_T16_for	TTACGCGATACAGTCATCC	psaD_revMP_ncol	CCATGGCAGTCCATGTGATGGCATGGCG
AC_T17_for	ACCTGATTGCACCAACAAGG	rbcL_forSP_ncol	CCATGGATGTCAAGCGAAGCCCTG
AC_T17_rev	ATGGGATTGTATCAGGGGAC	rbcL_forTMD_ncol	CCATGGAGTTCTTCTCTGTCTTCTGGATC
AC_T14_for2	TACGAGTTCGTGATCCAAGG	rbcL_forTP_ncol	CCATGGCACCCAGGGATAAAGGCTGG
AC_T16_rev	ACCAACTAAGGTCACCGACC	rbcL_forTP2_ncol	CCATGGCGGAACCTCGCGCTTGG
AC_T18_for	TGTGCGGTATTGCATCCACG	rbcL_revMP_ncol	CCATGGTTGGGTAGCGCATCTTGCACTCC
AC_T18_rev	ATGATAGTCTCCGATCGAC	rpl33_forSP_ncol	CCATGGCACATGATGGCAGGAGTTGG
rpl33AC_EcoRI_for	GAATTCATGACACTGATGGCAGG	rpl33_forTP_ncol	CCATGGTCCAGCTTCATGCAGGCTC
rpl33AC_BamHI_rev	GGATCCACCGCCAGACACAAGGTG	rpl33_forTMD_ncol	CCATGGGCAGGGAGTCTGTTGCAG
gpdA_Ecofor_AC	GAATTCATGTCCAGCTCCAGACACAG	rpl33_forTP2_ncol	CCATGGTCTCGCAGGTCAAGTCC
gpdA_Bamrev_AC	CCTAGGTCATTCTCGGCATCCACC	rpl33_revMP_ncol	CCATGGCAAGCCCTTCAACTACGATGC

9.4 Sequenzähnlichkeit isolierter *minicircles* zu bisher bekannten *minicircles* aus *A. carterae*

Name	Länge [bp]	codiert	Sequenzähnlichkeit zu (NCBI AccessionNr.)	blastn %
AC T1	2492	-	AC MC33 (AJ318067.1)	94
AC T3	2343	<i>psbA</i>	AC MC <i>psbA</i> (AJ311632.1)	84
AC T4	2677	23S	AC MC 23S (AY004258.1)	93
AC T5	2666	23S	AC MC 23S (AY004258.1)	94
AC T6	2261	-	AC CS-21 MC (DQ507216.1) (-)	71
AC T7	2496	<i>petD</i>	AC CS-21 MC <i>petD</i> (DQ507217.1)	93
AC T8	2510	-	AO MC4 (AF401630.1)	93
AC T9	2696	23S	AC MC 23S (AY004258.1)	93
AC T10	2031	-	-	-
AC T11	2704	23S	AC MC 23S (AY004258.1)	93
AC T12	2255	<i>psbB</i>	AC CS-21 MC <i>psbB</i> (DQ507220.1)	89
AC T13	2364	<i>psbD/psbE/psbI</i>	AO MC <i>psbD/E/I</i> (AJ620761.1)	98
AC T14	2676	-	AO MC4 (AF401630.1)	85
AC T15	2336	<i>petD</i>	AC CS-21 MC <i>petD</i> (DQ507217.1)	93
AC T16	2033	-	AO MC4 (AF401630.1)	91
AC T17	2029	-	-	-
AC T18	1868	-	-	-

9.5 Zusatz zur Klassifizierung der Transitpeptidklassen I und III

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
Glutamat-1-Semialdehyd Aminomutase	I	AIRAMEMTAVSSMAPAFAAPVRVQGAAQGLQG PQLNRHRATSEVSGSDATAAAATVAVVAGLA GGRKRHKVAARARVLQRRVQVAHKETSDKIFA EAQDLMPGGVSSPVRAFKS VGGNPVVFDRVKGA YAWDVDDNKYIDYVGTWGPVAVGHADDDVLKAL EEQLAKGTSFGAPSALENVLAKMVIDAVPSVEMV RFTNSGTEACM?MLRLVRAYTKKDNVIFEGCYH GHADSFLV??GS	Alex. cat.	ATAAAAT VAVVAGL AAVSGG R	21	1,434	gi 186961639
PsaC	I	MQFPLRAVLAGAALACSARLATLAFAPSAAPLVST RTTAVGSGLQAFGAASGTQEGSQSSFAGVVLGA ALGAAAGWAQRRGKLVARRSHAVKIYDTCIGCTLC VRACPTDVLEMVPATVNAKQVASSPRVEDCVGC KRCETACPTDFLSIRVYLQENEETQYSLGLDMADW S	Alex. cat.	SSFAGVV VLGAALG AAAGWA	20	1,211	gi 186956619
Phosphoglycolat Phosphatase	I	MDKTKKTLVGAGAAAACVLAAPGQHAFLQOY GGVRSSLLRRPVSVREGVGADMPAPVGVAGGAI AAGLVGSIKRSSSRQLSTATSAVMNQATQK LTQPAPFLDGVDFIFDCDGVWIRGDSLIEGPNVLT KLQAGKIFFVTNNSTKSRAGYKGFSTSLGLDVNP EEIFSSFAAAAYLEKTNFKATGKRVYIIGERGISEEL DLIGVPWAGAESFKDMVPFMGSGGRW?R	A.c.	APVGIVA GGAIAAG LVGSIA	20	2,38	gi 39544177
Pbs27/TLP	I	CVLASAFAGLLALPKCFVASPGPSVSELEVSRRAML VPGVLGAVGVVSSSPAFVQVDPDKIKSDPFELLS VDPTDKKQDRAEFYMKRNYKGDTEQLLKHMRAG VLDKGTNNMERYNKRKVEELDDWVALYRRQDKF AGRQSFYTMYTAIETLASHYTSYGKFPFKNRRPR FYELLNIAEKYLDKGK	A.c.	RAMLVP GVLGAV GVVSSSP AFAI	23	2,562	gi 39544130
Lhc Polyprotein	I	MSLSKPAVALATLAAAACPAAFQPSQTAMRPAG REGRQTRSSVPAEMSSASSSTLSGAATVTVSGAATL AAAAMFMANTRHVAKPQAKTAMAFGGGAPGMA GFDPSKELGVQEPLGFWDPAAGFMKEGDEALFRY RATEIKHGRVAMLATMGYITPEITGKLPGLSPGTG LKFEDIPNGLGAISKVPALGWAQMIAYAAFCELSQ DQSPGTPGAKGDFGFKVLTSSDPVEL?KKLSA?LAN GRL?WWPSLACSSRMV	A.c.	TLGAAV TVSGAAT LAAAAMF MA	23	1,617	gi 39544675
VIPP1	I	ASVGMQRRSAVTGNRPTLLAWCLLAAVAANVNH ARLTWVSFSTQGPFCFAGHSTGRRNTECVTRHA? NLFERFSRVVKSNNVQALQSMEDPEKILETAVTD MQGDLVKVRQSYAEVLATQRRQLTQIDQQNEVA DEWYKRASLAVEKGDDELAKEALNRRQAAVDTVL GLNQQLHI?TGNVDKL?DSVKSLEAK	A.c.	TLLAWCL LAAAVAA VNHARLT WV	23	-0,421	gi 39545027
Mg-Chelatase Untereinheit	I	HTLCGFLAMAAFVPGVPSVPALVAESTGFDQYRKT SLRHQVSSPASVRPLRSDTPKHTDATAAQVSLAAV SAAGIGMSIAVAQRRRTRARLAEARETSRIVRQSM AVDERLAAAEAAEQDETNNKWRGLMIPMTRVVGL EDIKLALQLASVDPGLGGVGICGGHGTGKTILARSL RGILPKIEVVKNSICNLDPEMPEEWDALSKERMAG KTDTKVDDCPFVELPLGCTEDRLVGSLDVQASMD QGKPVFE	A.c.	VSLAAVS AAGIGM SIAVAQR RRT	23	2,065	gi 39542869
ChlH, Mg-protopyrphyrin IX Chelatase	I	FVAMALAAFAASSQSLPKSVPIGTDAQQRATAQPI LLIQGAAAPQARSASGLAIGATVCCFAMSTPLR SQYKRKGGRRTVAAVATAEATEVAEEKEDSRPVF PFAIVGQAEMKLSLILNVDPKIGGVMLGDRGTG KTTTIRALVDLLPLIECVADDPYNSSPEELDAMSDE VRRRRDAGEDLPVVQRKVPMDLPLGATEDRVC GTIDIEKALT?GKKAFEAGLLARANRGILYVDEVNLL DDTWWMCSWTV	A.c.	IASGLAIG ATVCCFA MSTPLR	21	1,182	gi 39543025

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCB
Delta-Aminolevulinic acid Dehydratase	I	LSTDLSGNARPWFVSCMASVSVALAAAGAVSRR NRSGRSSRHAVKEAKASVRVPDKTPTDCAIEIRRRP RRNRRSAAMRQMFAENKVTAANFIMPLFVHDGE EDIPINSMPGVS RVGVD TGLLREVEEARKYGVKSV VIFPKTPEDLKT PCGEECWNP SGIAQRAISNVKKAF PDVVVYTDIALDPYSTFGHDGIV?SDGVIMNDETIH HLCSRPLCS	A.c.	WVFS CM ASVS VAL AAAGAV SRR	22	1,406	gi 39545529
PsaD	I	MLLAGLLCAVGTTFFVSTVFVSAASPGALRGARVA HAGHQESSLSAASLTSVAVVAAVGMALTRSPSSV VRRAPNTPKSSPDTLAGNRTEASAVSRPYDKFND NYPLSSPDQKRTEVTTAEIPREDLVDSPKFPLFGG SANGYMSKATREHAIWTAKEEATFEMPTSGW AMMNKGENLCYFRK?EQCIALCKQLRSMKINDVKI YRLSKDGEVTLHPSDGVFPEKVNKG	A.c.	LSAASLTS VAVVAA VGMALT R	21	0,639	gi 39542223
Rpl33	I	HTDGRSWGWTPCILAVSTLCVTLLSSGSSFMQAL QQPRYSTALPSSGRAVSRVFGAASPAQGGGQA GSPVAAILLCTVAAAIGRLHVSRRSVPTRAVLCS NQLAPMPSAGISALQARDVAARAHKKPTKKGRKL VVLECTEQRMVKGDPGAGGPRGGVSRYVTEK NVRNTPELLELRKFNKFLGRYTVHRELKGLA	A.c.	AGSPVAA ILLCTVAA AAIGRL	21	0,606	gi 39545494
Rbcl	I	MSSEALSTVFTIGAGDATLTRAHPGIKAGQLRGVP MSMDAAELLPTAEGASSSVVLGSVAVGLVGAG LRSRNSRLAKKSGKRSIVARKALDQSSRYADLSLTEE QLIQGQHVLVAYIMKPKAGDYDLATAAHFAAESS TGTNVNCTTDDFTKSDALVYYIDPENEECKIAYP NLLFDRNITDG	A.c.	SVVLGSV AVGLVG AGLRSR	19	2,172	gi 12025424
Ferredoxin-NADP(+) Reductase	I	MSLAFVPGAVPAIGEVVLQPASLRGSEGAPLASSP STGARLAASTLAVAVVGVLGARVTKKSVTCRATAV KKKGVRVVEGKEIPWNLFSPKAPYQGGVVKNNQGH EHTITKPNSDAPSDANWETVHVTFDHGGKVPIEG QSIGIIAPG	C.h.	ARLAAS T LAVAVVG VLGARVT	21	0,344	*
Rbcl	I	MAFRNRNSVAILAAVAVVCAFFSQTSSTYTQGW PYLHQKTPGTTS PYWADVG YFADGTS IVAAGNAI NHGPPDATDPHTPGSPLAESTYLANVG YFVDGTSK VRAGNAINHGEPTDPHTNGSPLPSSKYMAE V YFVDGTDVTKAGNANNHQ	C.h.	YWADV G YFADGTS IVAAGNA IN	22	/	*
Transketolase	I	MAFGSLLLWTSAAALVAPTVA FVPQGATQLDHAN TDWFRVSRVKEVSATSQASKAENPQGTWPAS CLFIGLGLGYACASRSARQSRVALAAQKAQPAR TPVAYPIFNFRWLAIHAITVPTVFFLGAISAMQFIQ R	H.t.	GTPWAS CLFIGLGL GYACA	19	0,921	*
Lhc Protein	I	MTRAGPLPITVLLLVA AVLARVAGSPLQLFHA AGTPFAGRVAWQAVQQT VSGVAPRPLSLHPVLLG AQPTGRPSKAALPVPVAVNTNPRRGFLAAGAA AVACALLAARSHRAEAAARDAIAMAQA GRKVPK PQEVLDTEAVVRYFGATALQWGLITGT LALLDQG NAYLTEVLAAPDWATKGFVIFFFLTAVRSRVFSPL DNSRPT	H.t.	RRGFGLA AGAAAV ACALLAA R	21	0,195	gi 58613639

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCB
PEP synthase	I	MPSMSKESRRTRQVVLAAGASAAVAAGVSTANG FVTGPALRTLPTQTTTQSGYVASAGEAAPQNSA LLSGGCFALAASAVAVRSGARKARRSAVATRAV STETATDCINAIRFLAVDAINKSNSGHPGAPMGQA PIGFCLFAETMDFNPNPDWINRDRFVLSGHGC MFQYSLHLTGYSVSMDDIKQFRQWGSKTGPH PENFETAGIEVTTGPLGMGVSNVGLAAEAHNA AVYNKPGMPLIDHYTYCIMGDGCCQEGISHESCA AGHLGLGLVIFYDDNGITIDGHTLSFTEDVGKRY EAYGWQVLTVDGNTDVAIRQAIDAKACTDKP TLIKVKTIVIGYGSFNKADSHDAHGAPLGKDEGQAT RDQLGWKYGEFEVDPHVYETRAHGARGAKKEE WNNMWGEYKKAHPELAEQFRIVVDKKLPANW SDCLPKATPETAGKATRLHSQDCLNIAIANTLPELIG GSADLAPSNMTLMKCTGDFLKGTYDGRNMRFGI REFGMGAVANAIISLDRGLVPYCATTFTFSDYMRN AIRVAALAKAGTIFVTTHDSIAVGEDGPTHQPIETIP SLRMIPDLLVMRPADCNESGAYKVAVELSKNESR PTFMAFTRQALPNLPNSSIENTEKGAYAVLDPADP DIVLIGTGSEVSVCEAAKEMKDKKVVVSMPCW ELFRAQPQSYKDQILPKGVPTMSVEAAVTMGWG EWSDAHVGINCFGASAPGNTCMDKFGFNVPNVV SCANRLKGEKGVLSGDSQKGH	H.t.	SALLSGG CFALAAS AVAVR	19	1,655	gi 58613541
Ribose-5-Phosphat Isomerase	I	MALTFVSSVFGTAVAPAPALLRGSAAQSPAAAGS LVTPSVAMLVCGAVAVGKRSRKTGTARRFFGGA GAPAPKTITSYKDFADPWLGSAADLGFDPNVSISA GTFDKTNKSEEAAYYNYRESEVKHGRFAMTFLAI FFEEADRSVAVLHQLGQVKIEDKLDGTLGLDEVQAP VLLAGLALQAFAEFNLQREKKDGFSSIEYKKDRCP GDLGFDPLGLGKAGADVKGLHNIEVNTGRLAMI GLTTLFKEFLVKDATLAAIL	H.t.	LVTPSVA MLVCGA VAVGKR	19	2,091	gi 58613545
Adenyatkinase	I	MPAHSKMSSKAVVAAGAGACMLAMSRGFVAPS APLSSNRVLSAGAATSATPVSQASAGVSTFAVGG AALAAGLATASASTSRRVKAKATKAVAVMPRGSV VARQARGGEEDTRVCIPLELRNTDVEKVGKSAS LGEMISQLSEVGVPPGGFSTTSFAYKEFLDKGGIN EFINDQLSDESIYTDVNKLMQVGKAIKIMDTPF QLDFEELKKQWERVSGGSETTFFAVRSSATAEDL PDASFAGQQETYNVMGYADMKQKVHLVFASLF TDRAISYRHRDGFHEKVKLCATCQKMRSETGSA GVMFSLDTESGFDVVFVTSAGLGETVVGTVN PDEWYVFKPTLEEGKNAIVSRTMGSKVKM	H.t.	VSTFAVG GAALAA GLATASA	20	1,982	gi 58618224
Lhc Protein	I	MAPAKTSSAAMLGLGAAGWLSSGSLFVSPTPPRA AELSRYPQATAAPAAGASQGFAPGVRCSILGVAA VTVAAGARRVARRATQDELKKQVGYKAVDDYVKS GTVIGLGTGSTAAFAVERVGQLLKSSELGDIPIPTSI RTKEQAESLGIPLATLDTHSDLDVAIDGADEVDPNL NLVKGGGGALFREKIVEMCAKKFIVIVDESKMCGG LGPGFIPVEIVPFCHETMREIAKLALAGCKPVL RLGDVANNNKPDGDKPAVTDNSNYIVDLVFETPIKD AVAAGEQLKNTVGVDHGLFTGMTTACIIAGSDGI SVKEA	H.t.	VRCSILG VAAVTVA AGARRV A	21	1,216	gi 58613535
Ferredoxin-NADP(+) Reductase	I	MPARRSKSAAVAVAVAGVAGECFVAPKAAASDL VASGRVAGVAATAPTDEASSFASAGVLPVSLGVV ALAAIGASKATASRRTREQHKVALAARGGADGRLV VIAGPPAAGKGTQCEKIKEKYGVHISTGDILRENV KAGTELGGKAKGFMDSGALVPSLIVDLVKDRLDQ PDVKEKGCLLDGFPRAPDQAQAMVDAGLKVQR MLLIEVPDETLVERGCCRRDPETGDIYHLKFKPPP EDIVDRVLVHRXDDQEEAIPNRLKGYHSQIDGIVPSS RTPWSH	H.t.	FASAGVL PAVSLGV VALAAIG A	22	0,98	gi 58613413

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCB
GapDH	I	MARIAGAVAAAAVSLAPSVPSIVGSSPAAQA LRGGAQQSSSTSTGNFAASVATVAVAAVAGVR RRQAKVAQNGARRDLAVAYEESGIELFDNGKFAQ GLIGADGAWGRYEYDPAQLSQWTEFVPYFREAEL KHGRIAMLAWVGLVVPDFVRIPGERYSFEAIPNVL DAHDKLNGAVGVNFQILFWIALVELCCAkkVFEW NSLETAGDYGLTGFFPADEEGQKRMRLAELKNGRL AMVAFGGAVTQ	H. t.	FAAASVA TVAVAAV AAGVRR R	21	1,074	gi 58613555
GapDH	I	PAGAAALCGAHWAFVQPAAPAQGEVAAPRRLRA SAGASAEGARFAGALPAATAIAGVSACCAAAATK KKGVKVVGKEIPWNIFMPKAPYTGKVVANDVHP QTLTETGDANWETHTLTFDHDGKVPYLEGQSIGI IAPGPDKKGETPAKIRLYSIASSAVGDDQTSKTVSLC VKRVVELDGKFANREVGEDKPKAGTGYPKNKVY RGVCSNHICMSVGGDDVLITGPTGAEMLLPEDPK ANIIMLATGTGIAPMRSYMRLLFHDKAGEAADGS RKFGQLAWLFMGVPYSKSLYDDEHLAYVKNYPD QFRFDYAVSREQTNAAGQKMYIQTMAEYTDDEL WELMQKENTHIYMCGLKGMEAGMEECFSAKAEA AGLVWKEFAKSMKKADRYHVEVYRGASTPSQWL LQHVQFS	L. c.	ALPAATA IAVGS ACCAAT	21	1,194	gi 58613455
GapDH	I	MAKALLIPATFGCAAFVAPGQSLRGVPAAGVQE ASQAPTAAPAQSSSVLSTTATLAGAAIAGGVVRR RGGRAAAKATAMRATGIAINGFGRIGRQVARIAM KDPEVELKLINASYDAEYLAYQMKYDSIHGRYNGTI EVDGDSLVIDGQKVALSHTRDPAEIPFKKHGAEYV CESTGVFLTTEKVQPHLKAGAKKVVFSAPAKDDSH TVVMGVNQETYKSSMECVSCASCTTNGLAPLVKCI NDAFGIRRLMTTIHAMTASQPTVDGASKDWR GGRAASGNIIPSSTGAAKAVAKVPEVAGKLTGMA FRVPTIDVSVVDLTCELEKATTYEEICAEVKKRAEGD MKGFLGYCDEDLVSTDFETCTISSTFDSKAGIMLDP TFVKLVA	L. p.	VLSTTATL AGAAIAG GGVVRR R	22	1,339	gi 58618206
GapDH	I	MKQFASVAVVGCALFCVCSFTSAFVAPAPSLRRAQ HKDIVTLARGQSEAKGSTWLTSTSACALLIGAVAAR ALSTSRSSVTRRAVSMGINGFGRIGRQVARVAM KDPETELKLINASYDADYLALMYDTIHGTYDGTIE ADGDSLIIIDGHKVALSHTRDPSEIPFGKYGADYVCE STGVFLTADKVQGHFKGAKKIVFSAPAKDDSH VMGVNEETYKPSMKAVSCASCTTNMAPAVKVL QETYGIKRLMTTCHAMTASQPTVDATSKDWR GGRAGPGNIIPSSTGAAKAVAKVPAVKGLTGMA LRVPTIDVSVVDLTVELETPPTTYEEICAEVKKRAETD MKGYLGYTDEALVSTDFETCSTCTFSAKAGIMLDP PTFVKVMLWYDSEWAYSNNRVVDLIKMAKEDKMA	S.m.	TWLTSTS ACALLIG AVAAARAL	21	-0,125	gi 168279475
Sedoheptulose-1, 7-Bisphosphatase	I	MARGSFLAPLCLAAVVLGVWQLLPISFVAPSPRLR GVTSESAQVATAAPLERSHGSQSSAWLATGAACA LILSGAAARALSMGRQSSVAMRATGIAINGFGRI GRQVARIAMKDPEVELKLINASYDADYLAYMMKY DTIHGKYDGTVEVDGDALVIDGLKVALSHTRDPAEI PFTEHGAEYVCESTGVFLTTEKVEPHLKAGAKKIVF SAPAKDDSHIVMGVNDQTYDPSMTCVFCASCTT NGLAPAVKAVNDALGIKRLMTTIHAMTASQPTV DSASKDWRGGRAASGNIIPSSTGAAKAVAKVPE VKGKLTGMAFRVPTIDVSVVDLTCELEKATTYEEIC AEIKRRSEGDMKGFLGYTDEPLVSTDFETNTISCTF DAKAGIMLDPFVKLMWYDNEWGYSCRVVDLI KHMAKVDAAAA	L. p.	AWLATG AACALILS GAAARAL	21	-0,366	gi 4103873

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
Chlorophyll A-C Bindeprotein	I	MGLGSRSAAPGLTLLLAGCAALAGPLSFLAPGLGR QPARLRAGSGGAPASAAQGA VQAERPGAGCLAA GAGVLCIAAVGLAAARRSAARPAAVRRAEADDAY GASHTSFYTDAAVAKDKYDSIEEVMEKSLDKPLQG MVKELLAACVKITEALRVNLVTNDSNTFGDTQL TVDVIADDLLWDLAKSSQLVCEASSEEEPEIVKTNP DGQYVLCWDPLDGSSIVDNNWAVGTIVGVWDKS TGLLGATGRDQVMSLVALYGPRTTVFMTMDDGV YEFTLPGPNQWICSREKIEIKDKIFAPANMRAA QEVDDGYAKLIDHYMTNRYTLRYSGGLVDPVCQF TKTQGVFTNPTSKASPAKLRLAFAEAPFGRVEMA GGKTSDBGVSGQSVLDVKIEAVDQRTALAGSANEV DRFNETVLQKTPA	P. l.	AGCLAAG AGVLCIA AVGLAA RR	23	-0,43	gi 99903657
Fructose Bisphosphate Aldolase	I	MSLGVPAAVATALLAATPVGA AFVTPGTAGASPQ LRGPGAVGQAVGSAATVETQAGWTVGTSGASAA VLTAAYGVISIAARRARAIPLTGRRLMHLAA ESELGVQDPVGFWDPLGFASDGDVTA FKRRRSVE LKHGRICMLATMGYITPELTGKWPGLSPSEGVKF ADIPNGLAAISKVPALGWAQIVAYCGFCELSAGSD DWKTGTGPNFGWKVLTSSDPEERQKLSAEIANG RLAMVAIIGMFFQDGLTGSAGWDWALYDSDPLR	H.t.	AAVLTA AAYGVIS AAARRAR A	23	0,851	gi 27450755
Protochlorophyllid Reductase	I	MPSAVENVALLFGGAVATTALSSAFVAGSPVAQE AKTGLRAAGYAKSSQSSQSMGAMAGVGAVAGL AVAGVAGRRAGKNRTSMEAVGVINGFGRIGRQ VARIAMKDPETELKLINASYDSYLAYMMKYDTIH GKYDGTVEADGDSLIVDGEKIALSHTRDPAEIPFGE HGAEYVCESTGVFLTTEKVQGHKAGAKKVIKFSAP AKDDSHIVMGVNEDTYDPSMECVSCASCTTNGL APAVRVLQEKWGIKRLMTTCHAMTASQPTVDG TSKKDWRGGRAGPGNIIPSTGA AKAVAKVDPVK GKLTGMALRVPTIDVSVVLTVELEKETTYEEICAE MKKRSEGDMMKGLGYTDEALVSTDFETCPISTFD AKAGIMLDPTFVKVVCWYDNEWGYSSRVVDLIKH MAAEDAKA	A.c.	MGAMA GVGAVA GLAVAG VAGRRA	23	1,601	gi 32454981
PsbF	I	MPGKMTSVALMGVAGYAATALNAFVAPGAPTT QGATQQRQVRHLRQAQAAASQGASSVNVGA CALGAAALAAAGAKAGKRT PQRAQVARCATAVA KKIGFKNLPASVKAGVVTGQALVDLLGYAKEKGF PGVNIVGTGSINACMEAAKAGGPIMVTFSGGG QFIAGKAADNSDDKASIAGAVAGALHVRVAELY GVPVILHTDHCQKAWLPWFDGLMEANEYFEKN GEPLFSSHMLDLSEETLEDNIAICKYLERMAKVNL LLEMELGITGGEEDGVNDSDVSSRLYTQPEEVW QVYETLSSVPNGNFTVAAAFGNVHGVYAPGNVEL KPEILHNTQKYIKEKLGESDKPVSVFVHGGSGSSV EDIQYAEAGVIKMNIDTDTQWAFWDGMNKYQK KNVDYLQAQIGNPEGPEKPNKKYYDPRMALRAGE ESMADRLVKAMQDLKCIDVL	C.h.	VNVGAC ALGAAAL AAGAAK A	20	2,403	gi 56112313
TspO and MBR verwandtes Protein	I	MAPRTIAFTAAACGLATVTQLATTPKSSTDAFALQ GSTRSTPVLRTALSASTRVQVGRGSTWQTPTVTA AAVGAGLALAASRRQRQSKRTAKCSVVTRQAGDD ASNCIKLAVYGKGGIGKSTTSCNISIALARRGKKVLQ IGCDPQHD	H.t.	TPTVTAA AVGAGL ALAASRR	20	1,827	gi 39544134
Diadinoxanthin/ Violaxanthin Deepoxidase	I	LLLACAALLLSRLSNAGSGAFSIDPSRLPSGKERQ CAAKSCEALPAKGRSRAANA AVEAAVQSSNGLF PWATVAGFAAALLGAGAAKADLRADVPACLLQN CQGVLA KCLLSPNCAADLTCLGCTSSPDEGGCQV KCGDIFENDVVQEFNACALNPGKRRCVPRQRDN GEYPIPAESIAKDFDVSFNGAWYISAGLNPLFDS FPCQLHFFVGEPNMLDGS PGRLYAKI?WRVLDP DGEFFDRSTVHVLRC	A.c.	LFPWATV AGFAAAL LLGAGAA KA	23	-0,211	gi 39544586

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
Mg-Protoporphyrin O-methyltransferase	I	ASSLRARTFVARAPTLVQTRGRPTQQAEEIASGVA PLILGSQAALAAADAADAGGPPFLAIGVVAVVAGAA ALLLGAGGEGDVNDKEVVKNYFNNEGFNRWNKIY GETEDINPVQKDIRVGHQAQTVDRILSWLDKEVDGK EVCDAAGCGTGNLTIPLAERGALVSASDISAAMVAE AERRAEVALENAPGKKGMPNFVASDLEKLDGEYD CVCCVDVLIHYPPEKLDGMVGHSLASLRDRVILSFA PKTWYLLKRIEGLFPGPAKT	A.c.	FLAIGVV AVVAGA AALLGA	20	-0,688	gi 39543929
PsaC	I	MQARRILLASAAVAAVVFTTGENFATGPILASSR HAATHNPAAQARPSAEAAGSLALPFLGGAVAIAA VAAASRRGAKAATAMRAHAVKIYDTCIGCTLCVRA CPTDVIEMVPATVNAAKQVASTPRVEDCVGCKRC ETACPTDFLSIRVYLQENEETQYSLGLDLADWS	A.c.	LALPFLG GAVAIAA VAAASRR	21	0,56	gi 39544666
PsaC	I	MHSSRFANIMAVSLAGCAAFGLTQSFVSSISRFASP ESADAPSGGSRFTMSKVASTDVCVLAGVAAAAS LALGAAAGWNRKRASITARRSHAVKIYDTCIGCTLC VRACPTDVLEMVPATANAAKQVASSPRVQDCVG CNVVNSLPTDFLSIRVYL	C.h.	CVQLAG VAAAASL ALGAAA GWNRR	23	1,638	*
Geranyl Reductase/Hydrogenase	I	MAVKTSACLAALLTQTTAAADAFVAVAGQPQKIS VVQRGLRGAAASQESAAPAGSWASATAVAASVA VAAAVVPRRQRKAAGLAGASMVPNKNQRTIRDA KTIVCAGPRLPEGRKLRAVAVIGGGPGGASCADALA KGGCETYLIERKLDNCKPCGGAIMCMVGEFDLPT DLIDRKVRKMTMISPTNNEVQIGRTLKDDYEIGMV RREVLDNFLRERAAENGATLINGLFTQMRMPKSEK ESYVLTYNDFGDAEGDARKGVKKTLEVDVVIGADG ANSRVAKEIEAGDYEYIAFQERMRIPEDKMEYYK ERAEMYVGEDVSPDFYAWVFPKYDHAUVGTGTV VDKKGQKYQQGIRERAAPRIEGGEIIRVEAHPPEH PRPWRTKDRCTLIGDAAGYVTKCSGEGIFYAAKSG LMCASEIVAASENGTRQITQNDLMEYIRKFDISKYK PTYIVLDALQKLFYTSDAARESFDLCELDYVQQVT FDSYLYKTQVQGNSPIGDMVLLGKTVSSLVKYNYSKV PEMRQLA	H.t.	WASATA VAASVAV AAAVVPR R	21	1,637	gi 58613459
Atpl	I	MSRGGGALLRLVAIALAIHVGCRGVSVFVSMGMTQ RTERSVQAGNADMAVIAHQTPAAIAPARGLRSA SSGSHFAKGFSCETLLPSLLSARVMVSIGGAVARR AKAPVSDFQAPSGARNFQEMTLGFTTDIAKNNLG ESFYRPWVPYITIFLIFGCNWSGALI	A.c.	LLSARV MVSIGG AVARRA	19	1,706	gi 39543672
Ferredoxin	I	RVVCCLSFVAFIAPSTSITQKQAFRGAASGRAESTT LGSGALLGCAVVAAMVAGAVAVRRPSKTARQYTTQ VILPSLTWLKSGVSAGELAPGELRAVTLGGNDVLLG KTEGGQLFGVSNLCPHIGTPLSEGADIVGDIIVCPLH GSSWNVNSGELIDWCVPPIIGPVTGFLVEKKNIFV FDVRTGLFGTGEIEVQVGHQRKEGLRGLLEGCP	A.c.	LGSGALL GCAVVA MVAGAV AVRR	23	-0,196	gi 39542676
Ferredoxin	I	MASNTRVLPLILGVAAGVLSRLSLMPNHGSDAAF ATPQLAAHSIHRNCRPVQSSGAVLAQGGPLPAIVSG VPARQGVAAHFKVTLETPDGAQELECPEDVYVLD QAEIEGIELPYSCRAGSCSSCAGKVLGSDIDQSDQA FLDDDQMGDGYCLCTVYATSDVTIKTHCEDDEL	Alex. cat.	PVQSSGA VLAQGGL PAIVSGV PA	23	/	gi 186957154
Ferredoxin	I	MAKIVPTIIAAALCALVLSAVNTFVAPQLPVAQTV HQACRPVGGSAVAPAFGAAPAIISAKPARPGVAA HFTVKLQTPDGEQSFECDDVYILDQAEIEGIELPY SCRAGSCSSCAGKVIDGSIDQSDQAFLEDDQTDGSG FCLCTVYATSDVTIKTHCEDDL	H.t.	CRPVGGS AVAPAFG AAPAIIS	21	/	gi 58613443
Pcp	III	MGRSSKVRALGVSAVALAAVRGLSGTSFVPGPLS WHAPVAAVSAATMLPAAAFAYEIGDAANKLGD ASYSFSKEVDWKNGLFLQAPGSFLPLEALNAIYNMI VMGAAVDPSLLIAAASALY	Alex. cat.	LSWHAA PVAASVA ATMLAP AAFA	23	2,373	gi 186957898

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
Pcp	III	LDYNSFGRNSRDGRSSKVRALAVSAVALAAVRGLS GTSFVPGPLRRHAAPVAAVSAATMLAPAAFVDEIG DAAKNLGDSSYSFLIEVYCKNGLFLHAPGLFHPL	Alex. cat.	LRRHAAP VAAVSAA TMLAPA AFV	23	2,471	gi 186962121
Pcp	III	MGRSSKVRALGVSAVALAAVRGLSGTSFVGPPLSR HAAPVAAVSAATMLAPAAFDEIGDAAKKLGDA YSFAKEVDWKNGLFLQAPGFSQPLEALKAIKDMIV MGAADPKLLKAAASAHKKAIGSISGVNGVTSKA DWDSVNAALGRVIASVPESMVMMDVYNSVKGITD PQVPAYMKSLVNGADA EKAYEGFLAFKDVVKKNQ VASAGAPATVPTGDNIGVAAKALSEQSYPLKDIN WLSDIYLLKPLPGASADKALKAIKDMIVMGAADG NALKAAAHHHTAIGSIDAKGVTSAADYEAVNAALG RVIASVPKSMVMMDVYNFAAGLVSPITPNNMFQSV NALDANAAAKAFYTFKDVVASSQ	Alex. tam.	LSRHAAP VAAVSAA TMLAPA AFA	23	2,784	gi 62638121
Pcp	III	MVRSGKKAVVLA AVAFCATSVVQKSHGFVPSPLR QRAAAAGAAAASAATMFAPAFADEIGDAAKKL GDASYAFAKEVDWNNGIFLQAPGKLQPLEALKAIK KMIVMGAADPKLLKAAAEAHKKAIGSVSGPNGV TSRADWDSVNAALGRVIASVPGNMVMDVYDSVS KITDPKVPAYMKSLVNGADA EKAYEGFLAFKDVVK KSQVTSAAGPATVPSGDKIGVAAQQLSEASYPLK EIDWLSDVYMKPLPGVSAQQLKAIKDMIVMGAQ ADGNALKAAAEAHKKAIGSIDATGVTSAADYAAV NAALGRVIASVPKSTVMDVYNAMAGVTDTSIPLN MFSKVNPLDANAAAKAFYTFKDVVQAAQR	A.c.	RAAAAG AAAASAA TMFAPA AFA	22	2,402	gi 11545459
Pcp	III	MAKARKACVLA AVLALTGLRQSAFVPGPRGLAPM AAAGGMLAMAGAAPAHADKIDDAKKLSEASYP FLKEIDWSSDVYGLPTANPFQVLKAVDKMIVMG AAMDSAALKAGAEAHKKAIGSIDAKGVTTLDAYE AVNAAIGHMVASAGESKTMDVYNVFAGFNLGKD VGPYMMSKVNAADASAAYKAFLEFKDAVKASQR	H. pyg.	RGLAPM AAAGGM LAMAGA A	19	2,439	gi 11967751
Pcp	III	MGRSRTVRALATGVVLAATRCLHPANHSFVPG PLRRNAAPAAAAASAATMLAPAAFDEIGDAAKK LGDSSYFAKEVDWNNGIFLQAPGKFQPLEALKAI DKMIVMGVQADPKLLKAAADAHKKAIGSISGPN VTSRADWDSVNAALGRVIASVPEATVMDVYNSVS GITDPAVPAYMKSLVNGADA EKAYEGFLAFKDVVK RSQVSTAAAPPTVSASGDAIGEAACKLSEQSYPLK DINWLSDIYLLKPLPDATISKAIKAIKDMIMMGAKAD GNLLKAAQAHHQAIGSIDANGVTSLADYSAVNA ALGRVVASVPKKMVMMDVYNSMASLVAPTVPNN MFASVNPLDANAAAKAFYTFKDVVQAASQVA	L. p.	LRRNAAP AAAAASA ATMLAP AAF	23	2,809	gi 2102724
Pcp	III	MAKTARAVSVLLAGVCLCLPAFVPGGPRFARSVA PAAVGAGALGMLGAAPAYADKIDDAKVPSEKSY PFLKEIDWTSDVYGLPAQPLKVMATAIDTMLKM GAAMDPAALKTGVLHSQAIANMDSKGVATLAD YTAINSAIGHMISSVPASKTMDVYNFAKFNLGSD VGPYMMSKVNAADAQAAYKALMDFKDVVKASQ R	S.p.	RFARSVA PAAVGA GALGML GAA	22	2,026	gi 23986490
PsbO	III	MARTVRLALILVPSASLAFVQGPAPREVPRQAPS AGQFLSRSLLEAPDVEVPEVDVQPRSWLTSILSFGA MLGLAAGLLAPTATRALTAEQYSQLTYNQVRGSG ANRCPTVESQGSSVPKSGAKLTNLCFEPKSAFEVA ETAKGTEFVTTKLLRQTYTLAFINGNLEPNPITLRE YDGIHTLPTTVAAQRVRAILVLCQKTCRHG	Alex. cat.	RSWLTSIL SFGAML GLAAGLL A	22	-0,33	gi 186957203
PsbU	III	MARLALASALACLAAPAAAYVAPAHGAAAFHAS AKAPAMTPALEPAIEELEGASAQPLSMLAASVAVG AMLGWLSQRRQQVASAAAAA VVLAPAAAPAM VDIEGIQYLGSDKVDINNANVQAYRQFPGMYP AAGAIATHGPYKEVKEIYSIPNLDEKVAAVMKKYE A NLVCLPPNPAYYLDVNNFMYR	Alex. cat.	PLSMLAA SVAVGA MLGWLS	19	1,232	gi 186960429

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
PsbV	III	MAGRATCALLFLACLLGLSLHAAFTTGGSVRTVA HITSSLQSRSTSLHSASAPEPLAEEGEAPASPSWA AARLLSGCALGALLFASAHPALADLEDAIPVDGK GKTMNLTKEEVIRGKRLFNAAACATCHVGGGTRTN QNVGLGFEELSGAQPARNTVDGLVDYLNAPTTYD GLKDISEVHPSIKAADLWPKMQTMKQKDYDMS AYILYQIFTIPEKWGGGKQYY	Alex. cat.	AAARLLS GCALGAL LLFASA	20	-0,159	gi 186956400
AtpH	III	MARSVILTSVAAVAALVCVSSISAFVAAPAQAPRL QPQVAETTAALSVAALTVPTAAFADEGSVWPALS AVGAGFAIGLAAIGSGVGQGIASGRCIDGISRQPEV ADDLRGVLLLSLAFMESLTIYGLVIALVLLFANPLIK	A.c.	TTAALSA VALTVPT AAFAD	19	2,234	gi 39544128
PetC	III	LVALVAAAADLTGALSSAFVSPINATGGMVRRSS TDVASNIAMESMAGEYTGFPDMQRRLMNLVC VAATAVPVVVLGGGYLYFFYPVPADSGAGVEVG DINGNKIKLADWMKTHKSNDRELQGLKGAPYYL VTTETGVKDFAIATCTHLGCVVPWQKAVNKFCC PCHGSQYDENGHGSCAVLLHCPCHWRT?AV	A.c.	LVCVAAT AVPVVVL GGGYLYF FY	23	-0,522	gi 39544774
PetC	III	CFAAIALVALVAAAADLTGALSSAFVSPINATGG MVRRSSTDVASNIAMESMAGEYTGFPDMQRRT LMNLVCVAATAVPVVVLGGGYLYFFYPVPADSG AGVEVG DINGNKIKLADWMKTHKSNDRELQGL KGAPYYLVTTETGVKDFAIATCTHLGCVVPWQKA VNKFCCPCHGSQYDENGMMVVRGPAPLSPLANCA VVESGNIAV	A.c.	YTGFCF AAIALVA LVVAAA	20	-1,286	gi 39544783
PsbO	III	KAMPGLVAFALCGTCSAFQLPSQAPLGTSLRGQ AEQILPTAVEVSEESYDAGSWVRSVLGFGAALGLL AGIVAPMSARAITSEQFEQLTYEQVKGSLANRCP TVMEGSAIKVPGGARMKKMCFEPKFAVEAETK SGKKFVNTRLVTRQTYTLEQIEGQLKSEGNLTFVE EDGIDFAASTVQLPNGERVPLFTMKKLVAKSGS EFKPGFTWGGGEYVPSYRTGGFLD	A.c.	WVRSVL GFGAALG LLAGIVA	20	0,456	gi 39542629
PsbU	III	MAKVMFAVALLMAVPAHAFLQPRGPVAPLQ EKHAQIAEKTTPTEADEGAASFSSSILAMSVAVGV MFGMVRAADAMVDYSGLAYLGSDKVDINNAN VQAYRQFPGMYPTIAGLIGSNGPYKS?GDIYNIKGL TEPMKTVLKQYEGNLVCFPADPAYFIRPREQRPLP VR??RLPCTASSAHCILKKKKKK	A.c.	FSSSILA MSVAVG VMFGMV RAA	23	0,975	gi 39544187
PsbV	III	ASVLCCGAVMLGLSSTFVAPTGKPTSLPQQAIRHN TPVPELMSEGSSASSFSFAPLLAGVCMGLAVFVS GTTAPAFAGAIIEVPIVTDAGKSTTNLTKEQLGRGR LFNAACSTCHVGGGTRTNQNVGLDLESQGARPR RDNVEGLVDYLNPNPTTYDGLVDISEVHPSMKAAK VWPKMRFMKQQDLVDISSYIMYETQVITEKWGG GKIYY	A.c.	FSFAPLLA GVCMGL AVFVSGT T	22	0,901	gi 39542488
AtpH	III	MAMVRSVTXTAAALMMGVILVAGMTRAFVAVP ASLHAMQTTAVTKLPAAALSATAMTIPGVAHAAE DSVWIPALSAVGAGFAIGLAAIGSGVGQGIASGRCI DGISRQPEVADDLRGVLLLSLAFMESLTIYGLVIALV LLFANPLIK	C.h.	VWIPALS AVGAGF AIGLAAIG	21	1,259	*
PetJ	III	MIRAVCLTAAACLVVQAALCFVGPSPNPLVLQNAPS SVSSGSADQPASDAQPEISSHVAWNPLALGLALGL LAAVAGSRPSLAADLENGEAIFGANCAACHAGGN NSVVAEKKIKKEQLEKYLFGGYNVDAIKTQVTNGK NSMPAFGEKLGPDIDDVANWVYQATKWD	C.h.	VAWNPL ALGLALG LLAAVAG SR	22	0,457	*
PsbO	III	MEGVKHALPLALVLAIVLVVPQAFVATPASSPET LTDQRRGVLRGFAATAPEDVPSQSQAQPSWFSF LSLGAALGLFSVASSPVRAITAEQFSQLTYSQVLG SGLANRCPVNSNGSKSVKKGDRMKNFCLEPKS FAVEAETEGKEFVTTKLMTRQTYTLAFMEGSM TNPVTFQEEDGMDFAATTVQLPDGSRVPFLFTCK QLLAKGEGSEFKPGFTWGGFEVPSYRTGGFLDPK GRGMYTGYDQAVAPAAQADGKEGQDELFKETN KVFDIGKGAIEMEVNKNEDLGEIGGVFVSKQPGD TDMGAKAPKTILLKGIFYGKIV	C.h.	WSFSFLS LGAALGL LFSVVA	20	0,352	*

Name	KI	Sequenz	Organismus	TMD	Länge TMD	ΔG TMD	Accession Nr NCBI
AtpH	III	MARSMALTA AVL VAGAVVLSTLGS AFVAAPKAAQ APVQVPTAALSAAALVPTMAHADDGVWIPALSA VGAGFAIGLAAIGSGVGQGIASGRCIDGISRQPEVA DDLGRVLLLSLAFMESLTIYGLVIALVLLFANPLIK	H.t.	VWIPALS AVGAGF AIGLAAIG	21	1,259	gi 58618216
Cytochrome c6	III	MQRSVCIVAAALALYGASCFVMPMSMMGAPEVG RQAVREQALAAPEAASAGSWSPALGAALGL LVAVATGRPALAADLENGESVFGANCAACHAGGN NSVVPEKKIKKEALVTYGYDVAIIKQVTYGNCS MPAFGERLGPDDIEDVANYVFGQADKW	H.t.	LALGAAL GLLVAVA TGRPALA A	22	0,269	gi 58613493
AtpH	III	MVAPRSLVFTAGVLLSGFAAVISLGRAFPAPQVA RPAATGHAVDALPTAALSAAALVPTAAHAAESSV WIPALSAVGAGFAIGLAAIGSGVGQGIASGRCIDGI SRQPEVADDLGRVLLLSLAFMESLTIYGLVIALVLLF ANPLIK	L. p.	VWIPALS AVGAGF AIGLAAIG	21	1,259	gi 39540783
Hypothetisches Protein / Bestropin Familie	III	MRRRLRGLREAADFVCTLDGSVLHIAAAWALPSAT AAVAIHGEMKRHDVTPSGEGLMDGFNAFSFVLGF LIVFRTQMAYQRFWEGARLLRLVRGQWMNAASC VVAFC SAVPEKQQDV EEFHLFVRLMSLLFCTGLQ QVADMSDETFEILDVHGFDEDMRLYLASRPEHER CPIVLQWIQRLIVITLESNTLQIAPPIASRIFQELGQG IMVLNQAGAITSVFPFPYAQLMTVLLLIHTFVTPIV M?I?PSHLVLDPNFVPLQVCWS	A.c.	FNAFSFV LGFLIVFR TQMAY	20	0,877	gi 39542643
PetG	III	MAFRSKSGFLPMAIFTAVMALMLMPDGSFITAG SAATSTLGATTAALAPSAAQMVAVSPEAIDVGSSV NVATLTEGLICGIVMGIFPFTILGLLVSAWLQWKKG PTLGL	C.h.	LGATTAA LAPSAAQ MVAVSP EAI	23	/	*
PsbK	III	MTARRSHSMLFCALASLAAYSALRAAFVTPSSKAL RGSQEMFNHQAGVAAAAGAVIALPEAAQARLPEEF VIFAPIVDVLPSPFFFLLLAFLWQASVGFR	C.h.	VLPSIPFF FLLAFL WQASV	20	0,053	*
AtpH	III	AIRAMEMTAVSSMAPAFAPVRVQGAAGLQGG PQLNRHRATSEVSGSDATAAAATVAVVAGLAAVS GGRKRHKVAARARVLQRRAVQVAHKTETSDKIFA EAQDLMPGGVSSPVRAFKS VGGNPVVFD RVKGA YAWDVDDNKYIDYVGTWGP AIVGHADDDVLKAL EEQLAKGTSFGAPSALENVLAKMVIDAVPSVEMV RFTNSGTEACM?MLRLVRAYTKKDNVIKFE GCYH GHADSFLV??GS	Alex. cat.	AARLPAA ALSAAVV VAPTAA	20	2,088	gi 186964605

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Zauner für die Betreuung und Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke für die interessante Fragestellung, stets ein offenes Ohr, zahlreiche hilfreiche Tipps und Anregungen und dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Uwe Maier für die immerwährende Unterstützung, dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und vielen hilfreichen Anregungen. Außerdem danke ich ihm für die Erstkorrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Prof. Dr. Andreas Brune danke ich, dass sie bereit waren Mitglied der Prüfungskommission zu sein.

Mein besonderer Dank gilt auch Simone Stork für den Einsatz beim Korrekturlesen dieser Arbeit und vor allem, dass sie mich in der ganzen Zeit der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und mich mit meinen Launen ertragen hat.

Dem DFG Graduiertenkolleg 1216 danke ich für die Finanzierung und die Möglichkeit der Teilnahme an Konferenzen, Seminaren und Workshops.

Ich danke auch Dr. Andrew Bozarth für seine zahlreichen Anregungen, Tipps und Diskussionen im Bezug auf die vielen (Labor-)Besonderheiten der Dinoflagellaten.

Mein Dank gilt auch Marianne Johannsen, Dr. Kathrin Bolte und Dr. Andreas Klingl für die elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Weiterhin danke ich Kathrin und Daniel für zahlreiche interessante, Labor-abseitige ‚Diskussionsrunden‘.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Maier für die stets gute Arbeitsatmosphäre und den Spaß innerhalb und auch außerhalb des Labors.

Ich danke auch all meinen Freunden für die schöne Zeit in Marburg und die stete und teils intensive Ablenkung von dem Laboralltag.

Nicht zuletzt danke ich besonders meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe, die sie mir stets entgegen gebracht haben. Ohne sie wären diese Seiten sicherlich leer geblieben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Christopher Grosche
geboren am	07. Juli 1982
in	Winterberg (Hochsauerlandkreis)

Hochschulbildung

2009 - 2012	Promotion am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg Zellbiologie Prof. Dr. Uwe Maier „Spezielle Leistungen der Plastide: RNA-Edierung in Landpflanzen, Genomreduktion und Proteinimport in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten"
2008 - 2009	Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg Zellbiologie Prof. Dr. Uwe Maier "RNA-Edierung in dem Lebermoos <i>Pellia endiviifolia</i> und dem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten <i>Amphidinium carterae</i> "
2003 - 2008	Studium der Biologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg mit den Hauptfächer Zellbiologie, Biochemie, Genetik

Wehrdienst

2002 - 2003	Bataillon Elektronische Kampfführung 932 in Frankenberg (Eder)
-------------	---

Schulbildung

1993 - 2002	Allgemeine Hochschulreife Geschwister Scholl Gymnasium Winterberg
-------------	--

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation

Spezielle Leistungen der Plastide:
RNA-Edierung in Landpflanzen,
Genomreduktion und Proteinimport in
Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde weder in jetziger oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg (Lahn), den 06.07.2012

Christopher Grosche